



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**«ΑΝΑΣΤΟΛΕΙΣ Σ ΚΙΝΑΣΩΝ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΗ ΓΟΝΙΔΙΩΝ ΣΤΟΧΩΝ
ΣΤΟΝ ΚΑΡΚΙΝΟ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ»**

**ΑΠΟΣΤΟΛΙΑ ΠΑΠΑΣΤΕΡΓΙΟΥ
ΜΟΡΙΑΚΗ ΒΙΟΛΟΓΟΣ-ΓΕΝΕΤΙΣΤΡΙΑ**

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ..... (Επιβλέπων)
ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ.....(Μέλος)
ΤΡΑΧΑΝΑ ΒΑΡΒΑΡΑ.....(Μέλος)

ΛΑΡΙΣΑ, 2017



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ**



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»**

**«S KINASES INHIBITORS AND REGULATION OF TARGET GENES
IN THYROID CANCER»**

Στον πατέρα μου,
που πάντα προσπαθούσε
να κάνει ότι καλύτερο για μένα.

Ευχαριστίες

Για την παρούσα διπλωματική εργασία, η οποία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Φαρμακολογίας του Τμήματος της Ιατρικής Λάρισας κατά το χρονικό διάστημα 2016-2017 υπό την επίβλεψη του κ. Δήμα Κωνσταντίνου, θα ήθελα να ευχαριστήσω αρχικά την υπεύθυνη του μεταπτυχιακού προγράμματος, κ. Τσέζου Ασπασία, Καθηγήτρια Ιατρικής Γενετικής της Ιατρικής σχολής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας. Μου έδωσε τη δυνατότητα να διεξάγω ερευνητικό έργο σε ένα εργαστήριο που μου προσέφερε πολλά εφόδια για το μέλλον.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Δήμα Κωνσταντίνο, Επίκουρο καθηγητή Φαρμακολογίας του τμήματός Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και επιβλέπων καθηγητή της εργασίας μου για την πολύτιμη, καθοριστική και άμεση συμβολή του στη διεκπεραίωση αυτής.

Τις διδακτορικές φοιτήτριες του εργαστηρίου Φαρμακολογίας του τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας Κοτσώνη Ιωάννα, Σερέτη Ευαγγελία και Καραγιαννέλου Θεοδοσία, για τις συμβουλές τους και υπομονή τους από την αρχή μέχρι το τέλος της εργασίας μου.

Ευχαριστώ επίσης τη Δαουκοπούλου Αργυρώ, φοιτήτρια του μεταπτυχιακού προγράμματος Γενετική του Ανθρώπου πέρα από την άψογη συνεργασία μας στο εργαστήριο και για όλο το ακαδημαϊκό έτος στο μεταπτυχιακό. Καθώς και τους Μαυροφόρα Ξανθίπη και Πετρισλή Απόστολο.

Ευχαριστώ θα ήθελα να πω και στη μητέρα μου και στον αδερφό μου που καθ' όλη τη χρονική αυτή περίοδο ήταν δίπλα μου και με στήριζαν αλλά και σε όλους τους δικούς μου ανθρώπους.

Πίνακας περιεχομένων

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	13
1.1 ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ	13
1.1.1 Ανατομικά χαρακτηριστικά θυρεοειδούς αδένος	13
1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ.....	21
1.2.1 Επιδημιολογία καρκίνου του θυρεοειδούς	21
1.2.2 Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του θυρεοειδούς.....	23
1.2.3 Τύποι και στάδια καρκίνου του θυρεοειδούς	25
1.2.4 Μοριακή και κυτταρική γενετική του καρκίνου του θυρεοειδούς.....	28
1.2.5 Θεραπεία καρκίνου του θυρεοειδούς	31
1.3 Οικογένεια πρωτεϊνών των S κινασών	34
1.3.1 Ο ρόλος των RSK κινασών στον καρκίνο.....	34
1.3.2 Το μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK	35
1.3.3 Φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των S κινασών	38
1.3.4 Δομή και κυτταρικός εντοπισμός των S κινασών	39
1.3.5 Ενεργοποίηση των RSKs στον καρκίνο	42
1.4 Αναστολείς των ριβοσωμικών S κινασών	44
1.4.1 Αναστολείς των RSK : BI-D1870	44
1.4.2 Αναστολείς των RSK : GSK2334470	44
1.5 Γονίδια στόχοι των S κινασών : GSK-3 α/β	46
2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	48
2.1.1 Κυτταροκαλλιέργειες	48
2.1.1.1 Κυτταρικές σειρές καρκίνου του θυρεοειδούς – PTC και 8505c	48
2.1.1.2 Καλλιέργεια και ανακαλλιέργεια καρκινικών κυτταρικών σειρών	49
2.1.1.3 Θρυψινοποίηση κυττάρων.....	51
2.1.1.4 Απόψυξη και ψύξη κυττάρων.....	53
2.1.1.5 Προσδιορισμός του αριθμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο και χρώση με Trypan Blue.....	55
2.1.1.6 Συλλογή και αποθήκευση κυττάρων για λύση	57
2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ	59
2.2.1 Μέθοδος ελέγχου in vitro κυτταροτοξικότητας με χρώση SRB	59

2.2.3 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών με Western Blot Analysis.....	70
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	80
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	80
3.1 1 Κυτταροτοξική δράση των αναστολέων και μελέτ του ποσοστού ανάπτυξης των θυρεοειδικών καρκινικών κυτταρικών σειρών PTC ΚΑΙ 8505C.....	82
3.2 Ποσοτική μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης p90RSK μετά από επίδραση με Tac σε διαφορετικές χρονικές στιγμές	86
3.3 Ποσοτική μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης p-GSK3α/β μετά από επίδραση με τον αναστολέα Tac σε διαφορετικές χρονικές στιγμές.....	88
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	93
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	95

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι ο πιο κοινός κακοήθης όγκος του ενδοκρινικού συστήματος. Ο πιο συχνός τύπος κακοήθειας του θυρεοειδούς είναι το θηλώδες καρκίνωμα. Αυτοί οι όγκοι έχουν συχνά γενετικές αλλοιώσεις που οδηγούν στην ενεργοποίηση της οδού σηματοδότησης ενεργοποιημένης από μιτογόνο πρωτεϊνική κινάση (MAPK).

Η ριβοσωμική S6 κινάση 1 (RSK1) είναι μέλος μιας οικογένειας πρωτεϊνών με δύο περιοχές κινάσης, σερίνης/θρεονίνης. Οι RSKs αποτελούν άμεσα υποστρώματα της εξωκυτταρικής κινάσης 1/2 (ERK1 / 2), του σηματοδοτικού MAPK/ERK, και μεσολαβούν στις αυξητικές, πολλαπλασιαστικές και αντι-αποπτωτικές δράσεις αυξητικών παραγόντων και αγωνιστών που ενεργοποιούν αυτό το μονοπάτι. Στις διαδικασίες αυτές οι RSK λαμβάνουν μέρος φωσφορυλιώνοντας διάφορα μόρια καθοδικά σε αυτές, όπως τη GSK3α/β. Σύμφωνα με το ρόλο τους ως θετικοί ρυθμιστές του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και ανάπτυξης, τα επίπεδα RSK1 και RSK2 είναι αυξημένα σε διάφορους τύπους καρκίνου, όπως για παράδειγμα του μαστού και του προστάτη.

Βάσει των γνώσεων για την ενεργοποίηση του μονοπατιού MAPK/ERK και τις RSK, σκοπός της εργασίας ήταν να μελετηθεί ο ρόλος των RSK στον καρκίνο του θυρεοειδούς ώστε να βρεθεί κατάλληλος αναστολέας ως πιθανή θεραπευτική προσέγγιση του καρκίνου του θυρεοειδούς μελετώντας ταυτόχρονα και την έκφραση των υποστρωμάτων των RSK.

Ο τρόπος με τον οποίο έγινε η προσέγγιση αυτή είναι ο έλεγχος κυτταροτοξικότητας διαφορετικών ειδών αναστολέων με τη μέθοδο σουλφοροδαμίνης, SRB, σε πληθυσμούς θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων. Οι πληθυσμοί ήταν μια εγκαθιδρυμένη κυτταρική σειρά του καρκίνου του θυρεοειδούς (8505C) και καθώς και κύτταρα απομονωμένα από καρκινικά αδενώματα ζώου (PTC).

Στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση των RSK και GSK3α/β στις ολικές και φωσφορυλιωμένες μορφές τους με τη μέθοδο ανασοαποτύπωσης κατά Western και έγινε ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων.

Από τους αναστολείς που μελετήθηκαν, στον κυτταρικό πληθυσμό PTC έχουν παρόμοια δραστικότητα ενώ στα 8505C η καλύτερη δραστικότητα του Tac είναι εμφανής.

Στην έκφραση των πρωτεϊνών, ο Tac, με τον οποίο έγινε επώαση, φαίνεται να επηρεάζει τη φωσφορυλίωση της ser227 και της ολικής RSK ενώ η έκφραση της thr577 παραμένει σταθερή και στα PTC και 8505C. Η έκφραση της GSK3β φαίνεται να είναι η κύρια μορφή της GSK3α/β καθώς η GSK3α υπομονάδα δεν εμφανίζεται κατά κύριο λόγο και στους δύο πληθυσμούς και η έκφραση της GSK3β συνάδει με τα επίπεδα και τον τρόπο έκφρασης της RSK κάτι που σημαίνει ότι μπορεί να αποτελέσει έναν ακόμη πιθανό στόχο αναστολής στην αντιμετώπιση του καρκίνου του θυρεοειδούς.

ABSTRACT

Thyroid cancer is the most common malignant tumor of the endocrine system. The most common type of thyroid malignancy is papillary carcinoma. These tumors often have genetic alterations that lead to the activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway.

Ribosomal S6 kinase 1 (RSK1) is a member of a protein family with two kinase, serine / threonine domains. RSK are immediate substrates of extracellular kinase 1/2 (ERK1 / 2), signaling MAPK / ERK, and mediate in growth, proliferation and anti-apoptotic effects of growth factors and antagonists that activate this pathway. In these procedures RSK takes part through phosphorylation of various downstream molecules, such as GSK3 α / β . According to their role as positive regulators of cell proliferation and growth, RSKs' levels are elevated in many types of cancer, such as breast and prostate.

Based on the MAPK / ERK and RSK pathway activation, the aim of this study was to investigate the role of RSK in thyroid cancer in order to find a suitable inhibitor as a possible therapeutic approach to thyroid cancer while studying the expression of substrates RSK.

To approach this assume we studied the cytotoxicity of different types of inhibitors by the sulforhodamine B (SRB) assay, in cell populations of thyroid cancer. The populations were an established thyroid cancer cell line (8505C) and as well as cells isolated from cancerous animals (PTC).

The expression of RSK and GSK3 α / β in both their total and phosphorylated forms was then studied by the by the Western blot analysis and then the results were quantificated.

Of the inhibitors studied, they have similar activity in the PTC cell population while at 8505C the best activity of Tac is apparent.

In protein expression, incubated Tac appears to affect phosphorylation of ser227 and total RSK while thr577 expression remains stable in PTC and 8505C. GSK3 β expression appears to be the primary form of GSK3 α / β as the GSK3 α subunit does not appear predominantly in the two populations. Also the expression of GSK3 β is consistent with the levels and mode of expression of RSK which means that it may be directly affected by RSK and it may be another possible inhibitory target of thyroid cancer.

Σκοπός

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η διερεύνηση της έκφρασης των κινασών S6 στον θηλώδη καρκίνο του θυροειδούς, που αποτελεί την κύρια μορφή εμφάνισης της νόσου καθώς και στον αναπλαστικό θυροειδή καρκίνο στο πλαίσιο της έρευνας ειδικευμένων αναστολέων έναντι των διαφόρων τύπων καρκίνου του θυροειδούς .

Προκειμένου να πραγματοποιηθεί αυτό, εκτιμήθηκε το ποσοστό έκφρασης των ριβοσωμικών S κινασών και της GSK3α/β που αποτελεί γονίδιο στόχο, στις καρκινικές σειρές PTC και 8505C, που έχουν τα χαρακτηριστικά του θηλώδους θυροειδούς καρκίνου (Papillary Thyroid Cancer-PTC) και του αναπλαστικού θυροειδούς καρκίνου (Anaplastic Thyroid Cancer-ATC), αντίστοιχα. Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση αναστολέων στις S6 κινάσες στην εξέλιξη του καρκίνου στις παραπάνω καρκινικές σειρές μελετώντας τον ρυθμό ανάπτυξης των κυττάρων.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 ΘΥΡΕΟΕΙΔΗΣ ΑΔΕΝΑΣ

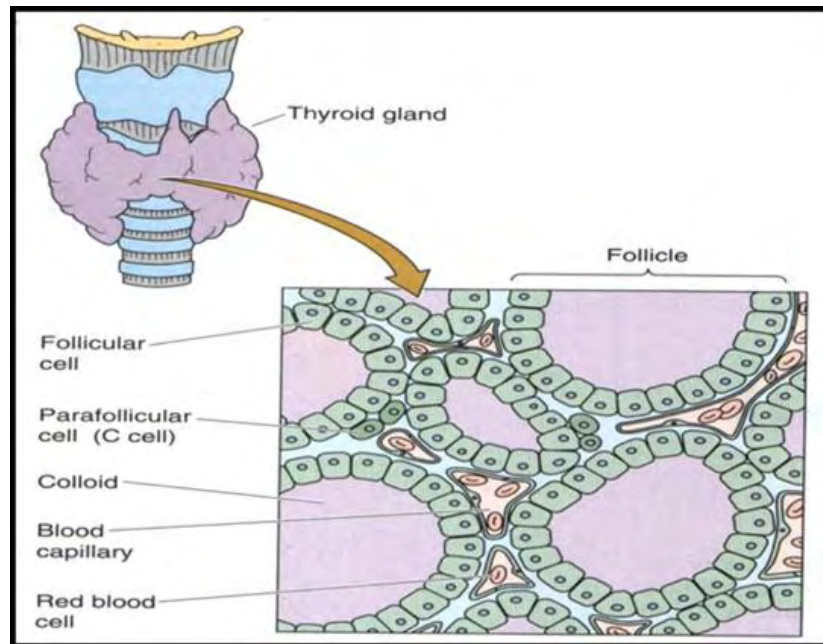
1.1.1 Ανατομικά χαρακτηριστικά θυρεοειδούς αδένος

Ο θυρεοειδής αδένος (**Εικόνα 1**) βρίσκεται στον κάτω πρόσθιο λαιμό, μπροστά από την τραχεία και αποτελείται από τον δεξιό και αριστερό λωβό και ενώνεται στη μέση μέσω ενός ισθμού και εγκαψυλιώνεται από ένα παχύ, ινώδη συνδετικό ιστό. Έχει ένα εκτενές δίκτυο λεμφικού συστήματος, που περιλαμβάνει τους περιφερικούς λεμφαδένες που ανήκουν στα επίπεδα από I μέχρι VII (πρόσθιο τρίγωνο, άνω τραχηλικός, μέσο τραχηλικός, κάτω τραχηλικός, οπίσθιο τρίγωνο, μέσος θάλαμος και άνω θωρακικός, αντίστοιχα).

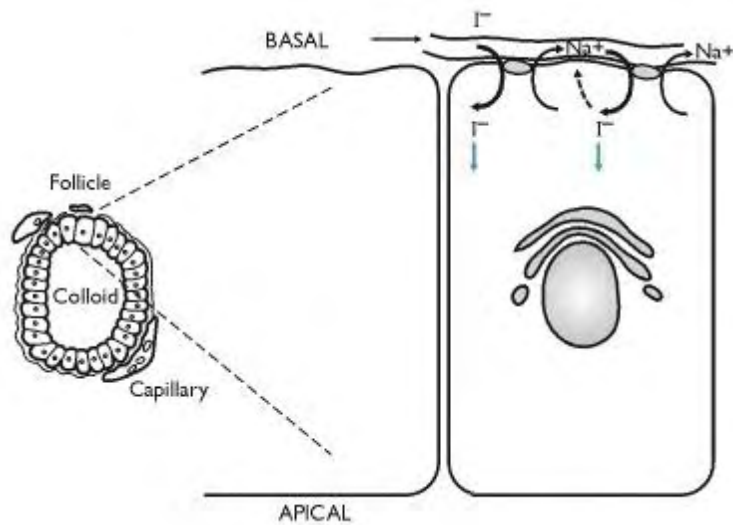
Η βασική συστατική μονάδα αυτού του ενδοκρινούς αδένος είναι το ωοθυλάκιο. Ένα μονό στρώμα από πολωμένα θυλακικά επιθηλιακά κύτταρα περιβάλλει αυτά τα ωοθυλάκια και η κολλοειδής ουσία εντοπίζεται στον αυλό των ωοθυλακίων. Τα φυσιολογικά ωοθυλάκια κυμαίνονται από 50 μέχρι 500μm στο μέγεθος (μέσος όρος 200μm). Τα θυλακικά κύτταρα μπορεί να ποικίλουν στο σχήμα, από επίπεδα σε κιονοειδή, ανάλογα με τον βαθμό ευαισθησίας τους στην ορμονική σύνθεση, με τα επίπεδα κύτταρα να είναι λιγότερο ενεργά σε σχέση με τα κιονοειδή κύτταρα. Οι πυρήνες τους είναι σφαιρικοί με διάχυτη χρωματίνη. Στη βασική μεμβράνη των θυλακικών κυττάρων βρίσκονται τα μόρια που μεταφέρουν το ιώδιο (I^-) μέσα στα θυλακικά κύτταρα. Αυτά τα μόρια ονομάζονται συµμεταφορείς νατρίου/ιωδίου, και προσλαμβάνουν ιώδιο σε αντάλλαγμα νατρίου (Na^+), έναντι κάποιας συγκέντρωσης και

ηλεκτρικής βαθμίδωσης, χρησιμοποιώντας ως εκ τούτου ενέργεια με τη μορφή φωσφορικής αδενοσίνης (ATP).

Στο θυρεοειδικό παρέγχυμα βρίσκονται επίσης και τα C κύτταρα, ή παραθυλακικά κύτταρα, αλλά δεν είναι μέρος του αδένος. Είναι παρόντα σε μικρές ποσότητες, ανάμεσα ή περιφερειακά στα θυλακικά κύτταρα. Τα C κύτταρα παράγουν καλσιτονίνη, μια ορμόνη που εμπλέκεται στην ομοιόσταση του ασβέστιου (Ca^{+}) και του φωσφορικού.



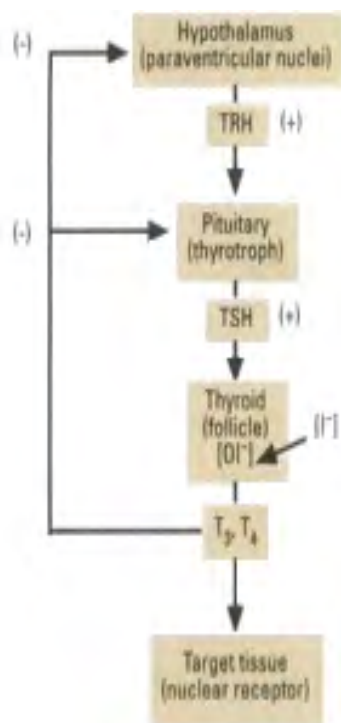
Εικόνα 1Α: Ο αδένας βρίσκεται στον κάτω πρόσθιο λαιμό μπροστά από την τραχεία. Ένα μονό στρώμα από το ωοθυλάκιο περιβάλλει καθεμία από αυτές τις βασικές μονάδες και το κολλοειδές είναι παρών στον αυλό τους. Στον διαθυλακικό χώρο μπορούν να εντοπιστούν φλέβες και μερικά κύτταρα συγκεντρωμένα. Προσαρμογή από Boron et al. (2012) Section VIII: The endocrine system, in Medical Physiology: A cellular and molecular approach



Εικόνα 1B: Ο διάυλος ιωδίου/νατρίου βρίσκεται στη βασική μεμβράνη των θυλακικών κυττάρων και είναι υπεύθυνος για την πρόσληψη ιωδίου μέσα στα θυλακικά κύτταρα. Προσαρμογή από Boron et al. (2012) Section VIII: The endocrine system, in Medical Physiology: A cellular and molecular approach.

1.1.2 Φυσιολογία θυρεοειδούς αδένος

Ο θυρεοειδής είναι ένας ενδοκρινικός αδένος και ο ρόλος του στον οργανισμό είναι να παράγει ορμόνες. Οι θυρεοειδικές ορμόνες περιλαμβάνουν τη θυροξίνη (T4) και την τριϊωδιοθυρονίνη (T3), των οποίων οι πρόδρομες ουσίες αποτελούν συστατικό μέρος της ορμόνης θυροσφαιρίνης (Tg), ένα μακρομόριο που είναι παρόν στην κολλοειδή δομή του θυλακίου. Η ορμονική σύνθεση είναι πολύ περίπλοκη, περιλαμβάνοντας όχι μόνο τον θυρεοειδικό αδένος για την παραγωγή ορμονών αλλά και το κεντρικού νευρικού σύστημα, το οποίο ρυθμίζει τη σύνθεσή τους και τη περιφερική μετατροπή των T3-T4. Δεδομένο είναι, ότι ο θυρεοειδικός αδένος αποτελεί μέρος του άξονα υποθαλάμου-υπόφυσης-θυρεοειδή (**Εικόνα 2**), ο οποίος είναι υπεύθυνος για τη ρύθμιση των επιπέδων κυκλοφορίας των T3 και T4 μέσω κλασσικής αρνητικής ανατροφοδότησης – αν οι T4 και T3 είναι στην κυκλοφορία σε χαμηλά επίπεδα, ο υποθάλαμος αντιδρά απελευθερώνοντας την ορμόνη απελευθέρωσης της θυροτροπίνης (thyrotropin-releasing hormone-TRH), η οποία με τη σειρά της διεγείρει την πρόσθια υπόφυση να εκκρίνει τη θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH). μέσω αλληλεπίδρασης με τον υποδοχέα της θυροτροπίνης (TSHR), η TSH θα διεγείρει στη συνέχεια τον θυρεοειδή αδένος ώστε να συνθέσει T4 και T3, αναπληρώνοντας έτσι τα επίπεδά τους στην κυκλοφορία (15). Η ενεργότητα της TSH διεγείρει τον καταρράκτη κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP), η οποία είναι υπεύθυνη για τη μεταφραστική και μετα-μεταφραστική ρύθμιση της θυροσφαιρίνης και της θυρεοειδικής υπεροξειδάσης (TPO) (16).



Εικόνα 2: Άξονας υποθαλάμου-υπόφυσης-θυρεοειδούς. Τα επίπεδα των θυρεοειδικών ορμονών T₄ και T₃ διατηρούνται από μια αρνητική ανατροφοδότηση. Ο υποθάλαμος ανταποκρίνεται στα χαμηλότερα επίπεδα T₄ και T₃ που βρίσκεται στην κυκλοφορία εκκρίνοντας την ορμόνη απελευθέρωσης της θυρεοτροπίνης, η οποία με τη σειρά της διεγείρει την παραγωγή της θυρεοτροπίνης από την πρόσθια υπόφυση. Η θυρεοτροπίνη στη συνέχεια διεγείρει τον αδένα του θυρεοειδούς για να σύνθεση T₄ και T₃.

Προσαρμογή από Hill et al. (1998) Risk assessment of thyroid follicular cell tumors, Environ Health Persp.

Οι θυρεοειδικές ορμόνες συντίθενται μόνο αν υπάρχει πρόσληψη ιωδίου. Μέχρι τότε, οι πρόδρομες ουσίες τους παραμένουν ανενεργές ενώ προσδένονται στη θυρεοσφαιρίνη στο κολλοειδές. Η σύνθεση των θυρεοειδικών ορμονών μπορεί να διαιρεθεί σε 5 στάδια: (1) παγίδευση οξυγόνου, (2) ιωδίωση, (3) σύζευξη, (4) ενδοκυττάρωση και πρωτεόλυση, και (5) έκκριση. Η TSH διεγείρει κάθε ένα από τα βήματα πέρα από τη εξωκυττάρωση του ιωδίου στο κολλοειδές. Εάν η TSH βρίσκεται σε υψηλές συγκεντρώσεις, ο ρυθμός που συμβαίνει η ορμονική σύνθεση και απελευθέρωση λαμβάνει μέρος πολύ πιο γρήγορα σε σχέση με όταν η TSH είναι σε χαμηλές συγκεντρώσεις.

(1) Παγίδευση του ιωδιδίου – σε αυτό το πρώτο στάδιο η πρόσθια υπόφυση εκκρίνει TSH, η οποία θα διεγείρει την δραστηριότητα του μεταφορέα ιωδίου/νατρίου (πλαγιοβασική μεμβράνη των ωοθυλακίων), αυξάνοντας έτσι τη συγκέντρωση του ιωδίου μέσα στα ωοθυλακικά. Η πρόσληψη ιωδίου πραγματοποιείται ενάντια σε μια συγκέντρωση και μια ηλεκτρική βαθμίδωση και η μεταφορά του συνδέεται με μεταφορά νατρίου και γι' αυτό χρειάζεται ενέργεια και οξειδωτικό μεταβολισμό. Σε αυτό το σημείο, τα θυλακικά κύτταρα εκκρίνουν θυρεοσφαιρίνη μέσα στον αυλό.

(2) Ιωδίωση – το ιωδίδιο διαχέεται στην επιφάνεια των ωοθυλακίων, και το αφήνει πιθανώς μέσω της πενδρίνης, σε μια κυψελίδα που σχηματίζεται στα θυλακοκύτταρα, εισερχόμενη στο κολλοειδές του αδένα. Στο εσωτερικό αυτής της κυψελίδας, το ιωδίδιο οξειδώνεται σε ιώδιο (I^0) από της υπεροξειδάση του θυρεοειδούς. Το ιώδιο προσδένεται σε τυροσινικές περιοχές της θυρεοσφαιρίνης (Tg), έχοντας ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό της δι-ιωδοτυροσίνης (DIT) και της μονοιωδοτυροσίνης (MIT)

(3) Σύζευξη – η σύζευξη των ιωδιωμένων περιοχών τυροσίνης (DIT και MIT) έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό T4 και T3 σε σύνδεση με τη θυρεοσφαιρίνη (Tg). Η T4 είναι αποτέλεσμα της σύζευξης ανάμεσα σε δύο DIT μόρια και η T3 σχηματίζεται από ένα DIT μόριο συζευγμένο με ένα MIT μόριο

(4) Ενδοκυττάρωση – προκειμένου τα T4 και T3 να είναι ικανά να εισέλθουν στην κυκλοφορία, η ιωδιωμένη θυρεοσφαιρίνη συσσωματώνεται μέσω ενδοκύττωσης στα θυλακικά κύτταρα με τη μορφή κολλοειδών σταγονιδίων. Αυτά θα συγχωνευτούν με τα λισοσώματα, έτσι ώστε η θυρεοσφαιρίνη να υδρολυθεί για να ενεργοποιήσει τις T4 και T3.

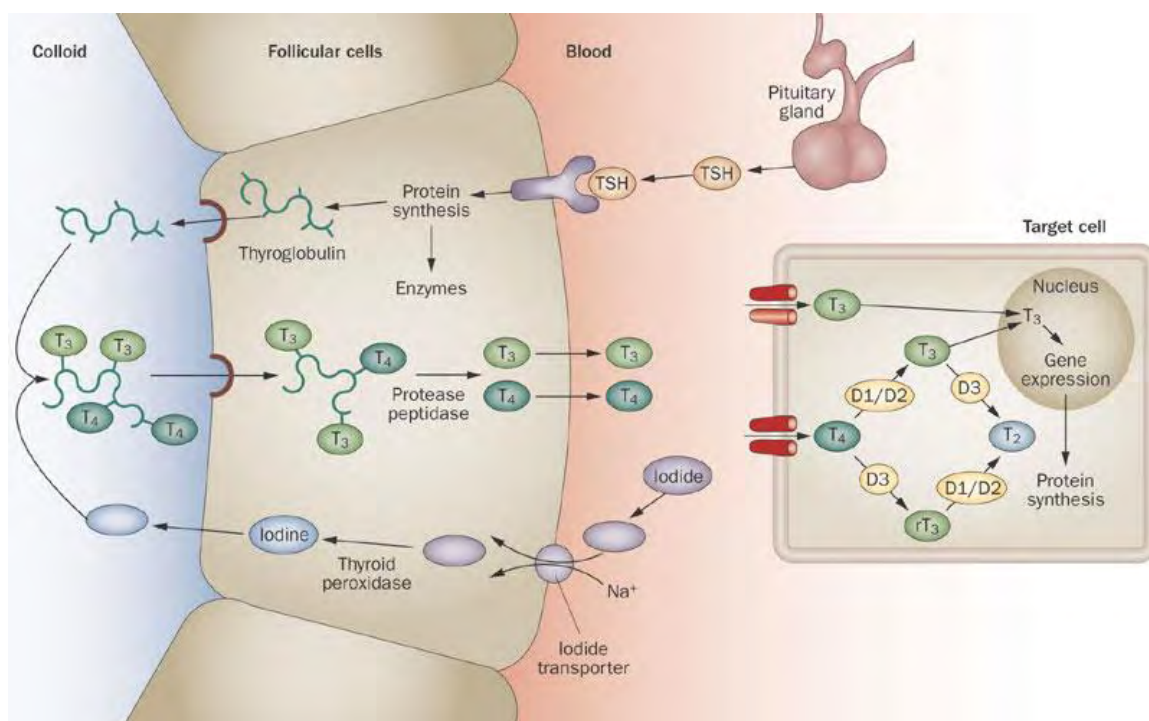
(5) Έκκριση – τελικά, οι ελεύθερες ορμόνες εκκρίνονται στη κυκλοφορία του αίματος, όπου προσδένονται σε πρωτεΐνες μεταφορείς για να μεταφερθούν σε κύτταρα στόχους.

Περίπου το 90% των θυρεοειδικών ορμονών απελευθερώνονται ως T4 και οι υπόλοιπες 10% ως T3. Από την απελευθερωμένη T4, χονδρικά το 80% μετατρέπεται από τις αποϊωδινάσεις σε T3 στο ήπαρ και στο νεφρό (περιφερική μετατροπή), και η υπόλοιπη

σε αντίστροφη τριωδοθυρονίνη (rT3). Η T3 είναι η πιο ενεργής μορφή, όντας 10 φορές πιο ενεργή από την T4, ενώ η rT3 δεν έχει κάποια σημαντική βιολογική λειτουργία (14).

Από τη στιγμή που θα φτάσουν στην κυκλοφορία, οι T4 και T3 προσδένονται σθεναρά με πλασματικές πρωτεΐνες, όπως είναι η θυρεοδεσμευτική σφαιρίνη (TBG), η αλβουμίνη και η τρανσθυρετίνη (TTR), και κυκλοφορούν κυρίως προσδεσμεμένες σε πρωτεΐνες. Αφού απελευθερωθούν από αυτές τις πρωτεΐνες, εκτελούν τις ενέργειές τους ιστούς-στόχους. Εκεί, μεταφέρονται στο εσωτερικό των κυττάρων είτε μέσω μεμβρανικών πρωτεϊνών είτε μέσω διάχυσης και κατευθύνονται προς τον πυρήνα, όπου προσδένονται σε πυρηνικούς υποδοχείς, οι οποίοι με τη σειρά τους δεσμεύονται στην χρωματίνη, ρυθμίζοντας την έκφραση συγκεκριμένων γονιδίων, είτε με αναστολή είτε με διέγερση της μεταγραφής (17).

Οι θυρεοειδικές ορμόνες παίζουν έναν ρόλο στην ομοίωση και τον μεταβολισμό του οργανισμού στο σύνολο, περιλαμβάνοντας το καρδιαγγειακό σύστημα, το αναπνευστικό σύστημα, τον κεντρικό νευρικό σύστημα, το έντερο, τους μυς, τα μαλλιά/δέρμα, τον σκελετό, τα νεφρά, τον μυελό των οστών, τις γονάδες. Στα βρέφη οι θυρεοειδικές ορμόνες είναι εξαιρετικά σημαντικές στην εγκεφαλική και σωματική ανάπτυξη, ενώ παράλληλα στους ανθρώπους είναι απαραίτητες για τη μεταβολική δραστηριότητα. Και η υπέρβαση (υπερ-θυρεοειδισμός) και η έλλειψη (υπο-θυρεοειδισμός) των θυρεοειδικών ορμονών έχουν μεγάλης σημασίας αντίκτυπο. Η έλλειψη ιωδίου, η οποία οδηγεί σε έλλειψη θυρεοειδικών ορμονών, αντισταθμίζεται με έκκριση TSH, αυξάνοντας την παγίδευση του ιωδιδίου, οπότε και τη συγκέντρωση των θυρεοειδικών ορμονών. Αντιθέτως, υπέρβαση ιωδιδίου γενικά οδηγεί σε ανασταλτικές επιπτώσεις στην έκκριση της TSH (16)



Εικόνα 3: Σύνθεση θυρεοειδικών ορμονών. Η TSH διεγείρει τη σύνθεση ορμονών του θυρεοειδούς και η συγκέντρωσή της επηρεάζει τα ποσοστά της σύνθεσης και απελευθέρωσης αυτών. Η σύνθεση των T3 και T4 ξεκινά μόνο όταν ιόν ιωδίου (I-) συµμεταφέρεται μέσα στα θυλακικά κύτταρα από τον συµμεταφορέα νατρίου/ιωδίου (NIS), μέσω ενεργούς μεταφοράς. Από τη στιγμή που εισέρχεται στον αυλό των θυλακικών κυττάρων, το ανόργανο ιώδιο οξειδώνεται από την θυρεοειδική υπεροξειδάση µε μία διαδικασία που ονοµάζεται ιωδίωση. Το ιονισµένο ιώδιο στη συνέχεια προσδένεται σε περιοχές τυροσίνης στη θυρεοσφαιρίνη και τις ιωδιώνει, παράγοντας ΔΙΤ και ΜΙΤ. Η σύνδεση δύο ΔΙΤ και ενός ΜΙΤ µε ένα ΔΙΤ αποδίδει T4 και T3, αντίστοιχα. Σε αυτό το στάδιο, παραµένουν προσδεδεµένα στη θυρεοσφαιρίνη, αλλά είναι έτοιµα να µεταφερθούν από τα κολλοειδή στα θυλακικά κύτταρα. Από τη στιγμή που θα εισέλθει στα θυλακικά κύτταρα, η θυρεοσφαιρίνη υδρολύεται, έχοντας ως αποτέλεσµα την απελευθέρωση και των δύο ορµονών στην κυκλοφορία του αίµατος. Οι ορµόνες είναι έτοιµες να µεταφερθούν στα κύτταρα στόχους. *Προσαρμογή από Cohen-Lehman et al. (2010) Effects of amiodarone therapy on thyroid function, Nat Rev Endocrinol.*

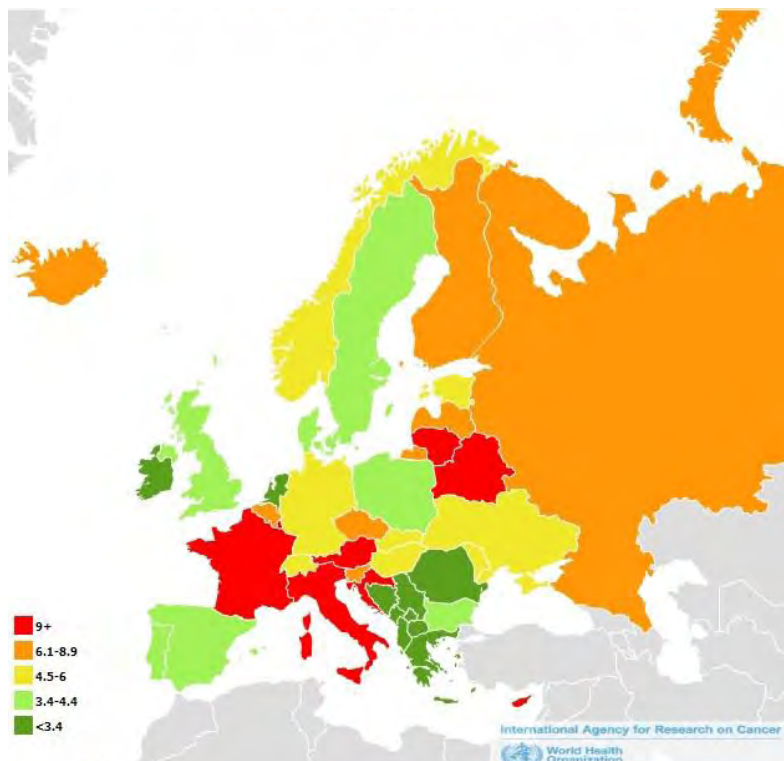
1.2 ΚΑΡΚΙΝΟΣ ΤΟΥ ΘΥΡΕΟΕΙΔΟΥΣ

1.2.1 Επιδημιολογία καρκίνου του θυρεοειδούς

Ο καρκίνος του θυρεοειδούς είναι η πιο κοινή ενδοκρινής κακοήθεια και αποτελεί το 1% όλων των καρκίνων, έχοντας μεγαλύτερο ρυθμό εμφάνισης στις γυναίκες σε σχέση με τους άνδρες, με αναλογία 3:1. Τις τελευταίες 3 δεκαετίες, έχει υπάρξει μια δραματική αύξηση στον αριθμό των ατόμων που έχουν διαγνωσθεί με καρκίνο του θυρεοειδούς. Υπολογίζεται ότι το 2017 ο αριθμός των περιστατικών που θα προκύψουν είναι 56,870 στην Αμερική και περίπου 2,010 θάνατοι εξαιτίας της ασθένειας. Ο ρυθμός εμφάνισης του καρκίνου του θυρεοειδούς έχει αυξηθεί τα τελευταία 10 χρόνια 5.5% κατά μέσο όρο ετησίως. Στο σύνολο, ο ρυθμός εμφάνισης έχει αυξηθεί σταδιακά σε ποσοστό περίπου 6%. Παρόλα αυτά, τα επίπεδα θνησιμότητας παραμένουν σε γενικές γραμμές σταθερά, με αναφορές για 0.5 περιστατικά στα 100.000 άτομα αν και υπάρχει μια μικρή αύξηση κυρίως στους άνδρες - +1.6% ετήσιο ποσοστό έναντι των γυναικών που είναι +0.9% ετήσιο ποσοστό. Στην Ελλάδα το ποσοστό εμφάνισης θυρεοειδούς καρκίνου για το 2012 (τελευταία χρονιά καταμέτρησης) ήταν 1.9% στον γενικό πληθυσμό και το ποσοστό θνησιμότητας 0.4%. Αντίστοιχα και με τα ποσοστά παγκοσμίως, στις γυναίκες η συχνότητα εμφάνισης είναι 3.1% ενώ στους άνδρες 0.7%.

Η αύξηση που παρατηρείται τα τελευταία 30 χρόνια οφείλεται σχεδόν αποκλειστικά στην αύξηση του ρυθμού εμφάνισης του θηλώδους ιστοτύπου (Papillary Thyroid Cancer - PTC) που είναι η πιο κοινή μορφή εμφάνισης (70-80%), με ασήμαντη αλλαγή για τον θυλακιώδη καρκίνο του θυρεοειδούς (Follicular Thyroid Cancer - FTC) (10-15%) και τους μη διαφοροποιημένους καρκίνους του θυρεοειδούς (μυελώδης και αναπλαστικός, <5%). Ο αναπλαστικός καρκίνος είναι ο πιο σπάνιος τύπος καρκίνου του θυρεοειδή και το ποσοστό εμφάνισής του είναι 1-2%. Παρόλα αυτά αυτή η μορφή είναι η πιο δύσκολη από όλες να ελεγχθεί και να αντιμετωπιστεί καθώς είναι ένας πολύ επιθετικός τύπος καρκίνου θυρεοειδή. Ο δεκαετής ρυθμός επιβίωσης έχει αυξηθεί και αυτή τη στιγμή είναι περίπου 93% για τους θηλώδεις και 85% για τους θυλακιώδεις. Στο μη διαφοροποιημένο αναπλαστικό καρκίνωμα (undifferentiated Anaplastic Thyroid Cancer) το ποσοστό 10ετούς επιβίωσης κυμαίνεται περίπου στο 14%. (22, 24). Σε

αντίθεση με τους περισσότερους όγκους (συμπεριλαμβανομένων καρκίνου του μαστού, του εντέρου-ορθού, του πνεύμονα και του προστάτη) των οποίων τα ποσοστά θνησιμότητας έχουν μειωθεί τις τελευταίες 2 δεκαετίες, στον καρκίνο του θυρεοειδούς έχουν αυξηθεί. Αυτή η αύξηση συνέβη παρά την πρόωμη διάγνωση και την καλύτερη θεραπεία των καρκίνων υψηλού κινδύνου. Η απόκλιση ανάμεσα στη ραγδαία αύξηση στο ρυθμό εμφάνισης και στη θνησιμότητα, επομένως, είναι λιγότερο σχετιζόμενη από ότι είχε αρχικά παρατηρηθεί, λαμβάνοντας υπόψη ότι η δυσάρεστη συμπεριφορά των θυρεοειδών καρκίνων θα επηρέαζαν τη θνησιμότητα μόνο μετά από κάποια χρόνια της αύξησης της συχνότητας εμφάνισης (22). Η άνοδος του ρυθμού εμφάνισης των θυρεοειδών καρκίνων μπορεί να αποδοθεί στην εξάπλωση των μελετών απεικόνισης, όπως είναι το υπερηχογράφημα, υπολογιστική τομογραφία, απεικόνιση μαγνητικού συντονισμού και ανίχνευση τομογραφίας εκπομπής ποζιτρονίων (PET), που εντοπίζουν τυχαία οζίδια του θυρεοειδούς (24). Κάποιοι επιστήμονες επίσης πιστεύουν ότι η πραγματική αύξηση οφείλεται στο περιβάλλον και στις αλλαγές του τρόπου ζωής.



Εικόνα 4: Εκτιμώμενη συχνότητα εμφάνισης καρκίνου του θυρεοειδούς και στα δύο φύλα στην Ευρώπη, 2012 (τελευταία καταγραφή)
(<http://eco.iarc.fr/eucan/Country.aspx?ISOCountryCd=300>).

1.2.2 Παράγοντες κινδύνου εμφάνισης καρκίνου του θυρεοειδούς

Υπάρχουν ποικίλοι παράγοντες κινδύνου που σχετίζονται με τον καρκίνο του θυρεοειδούς. Παράγοντες που μπορεί να συνεισφέρουν στην εμφάνιση καρκίνου θυρεοειδούς μπορεί να είναι είτε γενετικοί είτε περιβαλλοντικοί.

Η έκθεση σε ραδιενέργεια είναι αρκετά αποδεδειγμένο ότι αποτελεί έναν παράγοντα υπεύθυνο για εμφάνιση καρκίνου. Ο θυρεοειδής μπορεί να εκτίθεται περισσότερο στη ραδιενέργεια σε σχέση με άλλους ιστούς εξαιτίας της θέσης του στο σώμα και της ικανότητάς του να συγκεντρώνει ιώδιο. Ο θυρεοειδής είναι πολύ ευαίσθητος στη ραδιενέργεια σε μικρή ηλικία. Παιδιά που έχουν εκτεθεί σε ακτινοβολία συνήθως εμφανίζουν θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδή (PTC). Αυτό είναι εμφανές και από τη ραγδαία έξαρση των καρκίνων του θυρεοειδούς που παρατηρήθηκε μετά το πυρηνικό ατύχημα στο Chernobyl το 1986 (25).

Η έλλειψη ιωδίου προκαλεί αύξηση στη θυρεοειδοτρόπο ορμόνη (TSH), ενός σημαντικού αυξητικού παράγοντα για τα θυλακιώδη κύτταρα του θυρεοειδή. Αυτός ο παράγοντας κινδύνου δεν σχετίζεται με την εμφάνιση ή μη του καρκίνου θυρεοειδούς αλλά πιο πολύ με τον ιστότυπο που επάγει. Χωρίς να έχει αποδειχθεί μέχρι στιγμής στους ανθρώπους, η μειωμένη πρόσληψη ιωδίου οδηγεί στην εμφάνιση θυλακιώδους θυρεοειδικού καρκίνου έναντι του θηλώδους, που αποτελεί και την επικρατή μορφή.

Τα επίπεδα της θυρεοειδοτρόπου ορμόνης (TSH) και η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα είναι επιπλέον παράγοντες κινδύνου για την εμφάνιση της νόσου. Βασικός ρόλος της TSH για την εξέλιξη του καρκίνου του θυρεοειδούς ενδείκνυται από το γεγονός του χαμηλού ποσοστού επανεμφάνισης και της βελτιωμένης επιβίωσης σε ασθενή ποντίκια με τη νόσο, μετά από χορήγηση L- T4 που καταστέλλει την TSH. Παρόλα αυτά η έρευνα είναι αμφιλεγόμενη στους ανθρώπους. Συμπληρωματικά στα παραπάνω δεδομένα για τα επίπεδα της TSH στον καρκίνο του θυρεοειδούς είναι το γεγονός ότι σε ασθενείς που είναι σε προχωρημένο στάδιο έχει βρεθεί υψηλότερο ποσοστό TSH στον ορό. Η αυτοάνοση θυρεοειδίτιδα (ή θυρεοειδίτιδα Hashimoto), είναι η πιο κοινή αιτία πρώιμου υποθυρεοειδισμού στον δυτικό κόσμο και η οποία αυξάνεται τις τελευταίες δύο δεκαετίες. Η θυρεοειδίτιδα Hashimoto μπορεί να επηρεάζει την αύξηση του θυρεοειδούς

καρκίνου όχι μόνο με αυξάνοντας τα επίπεδα TSH αλλά επάγοντας την καθ' εαυτού αυτοάνοση διαδικασία, μέσω της παραγωγής δηλαδή προφλεγμονωδών κυτταροκινών και οξειδωτικού στρες, να προωθεί την εμφάνιση του καρκίνου.

Οι θυρεοειδικοί όζοι στον αδένα του θυρεοειδούς μπορεί να είναι είτε μονοί (Single Nodule – SN) είτε πολυεστιακοί (Multinodular Goiter – MNG). Ο επιπολασμός της κακοήθειας στους μονήρεις όζους υπολογίζεται ότι είναι μεγαλύτερος έναντι των πολυεστιακών, κάτι που φαίνεται όμως να ισχύει σε περιοχές χαμηλής πρόσληψης ιωδίου (δηλαδή όχι στις Ηνωμένες Πολιτείες).

Εφόσον η παχυσαρκία είναι ένα πολυπαραγοντικό σύνδρομο, η συνεισφορά στην καρκινογένεση του καθενός χαρακτηριστικού της (ο τύπος λιπώδους ιστού, μεταβολική διαταραχή, αντίσταση στην ινσουλίνη καθώς και άλλα) παραμένει ασαφής. Τελευταία υπάρχουν δεδομένα ότι η αντίσταση στην ινσουλίνη και η υπερινσουλιναιμία και όχι η μεταβολική διαταραχή μπορεί να παράγοντας κινδύνου για καρκίνο του θυρεοειδούς. Η ινσουλίνη ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση στον θυρεοειδή και διεγείρει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και μετατροπή των θυροκυττάρων. Η αντίσταση στην ινσουλίνη βρέθηκε στον 50% των ασθενών με θηλώδη θυρεοειδή καρκίνο έναντι του 10% στα δείγματα ελέγχου. Ο δείκτης μάζας σώματος (BMI) είναι κάτι που συνδέεται άμεσα με καρκίνο του θυρεοειδούς στις γυναίκες (22).

Η επιρροή της διατροφής, του τρόπου ζωής και της μόλυνσης στην εμφάνιση καρκίνου του θυρεοειδούς δεν έχουν μελετηθεί μέχρι στιγμής διεξοδικά και γι' αυτό το λόγο υπάρχουν ακόμη μόνο ενδείξεις. Πολλές μελέτες έχουν γίνει προκειμένου να διαλευκανθεί εάν η διατροφή και ο τρόπος ζωής ευθύνονται για την εμφάνιση καρκίνου του θυρεοειδούς αλλά τα περισσότερα αποτελέσματα είναι αντικρουόμενα (26). Έρευνες που έχουν γίνει επίσης για διάφορους μολυσματικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως για παράδειγμα το νιτρικό που συναντάται συχνά σε πόσιμο νερό σε περιοχές με έντονη αγροτική δραστηριότητα και σε κάποια λαχανικά και επεξεργασμένες τροφές. Υψηλά ποσοστά νιτρικού φαίνεται να σχετίζονται με την εμφάνιση καρκίνου του θυρεοειδούς. Επίσης, θεωρητικά, μαζί με το ιώδιο (που χορηγείται σε περιοχές με εμφάνιση καρκίνου θυρεοειδούς λόγω μειωμένης πρόσληψής του), διατροφικοί παράγοντες που μεσολαβούν στη δημιουργία ιωδίου και τη σύνθεση ορμονών, όπως για

παράδειγμα τα σταυρανθή λαχανικά, θα μπορούσαν να επηρεάσουν τον κίνδυνο καρκίνου του θυρεοειδούς (27).

1.2.3 Τύποι και στάδια καρκίνου του θυρεοειδούς

Η διάγνωση του καρκίνου του θυρεοειδούς γίνεται ιστολογικά μέσω βιοψίας αναρρόφησης με λεπτή βελόνα (FNA) και κατηγοριοποιείται σε 4 κύριους τύπους. Ο πιο κοινή μορφή είναι ο θηλώδης καρκίνος του θυρεοειδούς (PTC), είναι ο λιγότερο επιθετικός καθώς τείνει να αναπτύσσεται και να κάνει μεταστάσεις αργά. Παρόλο που αναπτύσσονται αργά, οι θηλώδεις καρκίνοι συχνά εξαπλώνονται στους λεμφαδένες του λαιμού. Αποτελούνται από πολυεστιακά θηλώδη και θυλακιώδη στοιχεία που σχηματίζουν περιοχές αδενοκαρκινωμάτων (24). Ο επόμενος πιο κοινός τύπος είναι το θυλακιώδες θυρεοειδικό καρκίνωμα (FTC), που είναι πιο επιθετικό από το θηλώδες και μπορεί να σχετίζεται με έλλειψη ιωδίου όπως έχει αναφερθεί στους “Παράγοντες κινδύνου”. Το Hürthle-cell καρκίνωμα, που είναι επίσης γνωστό ως καρκίνωμα οξύφιλων κυττάρων, είναι πιο δύσκολο να ανιχνευτεί και να αντιμετωπιστεί. Αποτελεί μια παραλλαγή του θυλακιώδους καρκινώματος και θεραπεύεται με τον ίδιο τρόπο όπως και το θυλακιώδες καρκίνωμα. Το μυελώδες θυρεοειδικό καρκίνωμα, καρκίνος μη-θυρεοειδικών κυττάρων (C κύτταρα) που εντοπίζονται φυσιολογικά στον θυρεοειδή αδένα, αντιπροσωπεύουν το 3% περίπου των θυρεοειδικών καρκίνων και σχετίζεται συχνά με πολλαπλή ενδοκρινή νεοπλασία 2 (MEN2). Τα C κύτταρα του θυρεοειδούς αδένα από τα οποία προκύπτει το μυελοειδές καρκίνωμα, φυσιολογικά παράγουν καλσιτονίνη, ορμόνη που βοηθά τον έλεγχο του ποσοστού ασβεστίου στο αίμα. Στο μυελοειδές καρκίνωμα η ποσότητα της καλσιτονίνης αυξάνεται κατά πολύ στο αίμα, κάτι το οποίο αποτελεί ευαίσθητο και εξειδικευμένο δείκτη για τον όγκο αυτό. Ο μυελοειδής όγκος μερικές φορές εξαπλώνεται στους λεμφαδένες, τους πνεύμονες ή το συκώτι πριν τον εντοπισμό θυρεοειδικού όζου. Αυτός ο όγκος επίσης είναι πιο δύσκολο να εντοπιστεί και διακρίνεται σε 2 τύπους: το σποραδικό και το οικογενές μυελοειδές καρκίνωμα. Η σποραδική μορφή αποτελεί το 80% των περιπτώσεων, εμφανίζεται συνήθως σε μεγαλύτερες ηλικίες και επηρεάζει μόνο τον ένα θυρεοειδή λοβό ενώ η

οικογενής κληρονομείται και 20-25% μπορεί να εμφανιστεί σε κάθε γενιά μιας οικογένειας. Τα μυελοειδή καρκινώματα του θυρεοειδή αδένα αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της παιδικής ηλικίας ή στην πρώιμη ενηλικίωση και εξαπλώνονται νωρίς. Οι ασθενείς έχουν καρκίνο σε πολλαπλές περιοχές και των δύο λοβών. Το οικογενές μυελοειδές καρκίνωμα είναι στενά συνδεδεμένο με τον κίνδυνο εμφάνισης άλλων τύπων καρκίνου. Ο συνδυασμός οικογενούς μυελοειδούς θυρεοειδούς καρκινώματος και όγκων από άλλους ενδοκρινείς αδένες είναι γνωστός ως πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία τύπου 2 (MEN2) και υπάρχουν δύο υποτύποι, η MEN2a και MEN2b. Και οι δύο αυτές μορφές προκαλούνται από μεταλλάξεις στο γονίδιο RET για το οποίο γίνεται αναφορά στη “Μοριακή Παθογένεση” του καρκίνου του θυρεοειδούς. Στην πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία τύπου 2a (MEN2a) ο μυελοειδής όγκος εμφανίζεται μαζί με φαιοκυτωχρώματα (παραγωγή αδρεναλίνης από τους όγκους) και όγκους του παραθυρεοειδούς αδένος. Στην τύπου 2b ο μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς σχετίζεται με φαιοκυτωχρώματα και με καλοήθεις αναπτύξεις του νευρικού ιστού στη γλώσσα και αλλού, που αποκαλούνται νευρώματα. Αυτός ο υπό τυπος είναι πολύ πιο σπάνιος από τον 2a αλλά ο μυελοειδής καρκίνος είναι πολύ πιο επιθετικός.

Το αναπλαστικό καρκίνωμα του θυρεοειδούς, γνωστό επίσης και ως μη διαφοροποιημένο καρκίνωμα, είναι μια σπάνια μορφή του καρκίνου του θυρεοειδούς. Αποτελεί περίπου το 2% των θυρεοειδικών καρκίνων και την πιο επικίνδυνη μορφή αυτών επειδή δημιουργεί μεταστάσεις νωρίς στους περιφερικούς λεμφαδένες και σε απομακρυσμένες περιοχές. Ονομάζεται και μη διαφοροποιημένος καρκίνος λόγω του ότι τα καρκινικά κύτταρα δεν έχουν την ίδια μορφολογία με τα φυσιολογικά θυρεοειδικά κύτταρα.

Κλινικά, ο καρκίνος του θυρεοειδούς διακρίνεται σε 2 κατηγορίες :

- (1) καλά διαφοροποιημένος, που συμπεριλαμβάνει τον θηλώδη και τον θυλακιώδη καρκίνο και
- (2) ελάχιστα διαφοροποιημένος, περιλαμβάνοντας τους μυελοειδείς και αναπλαστικούς καρκίνους.

Η Αμερικανική Κοινή Επιτροπή για τον Καρκίνο (AJCC), έχει ορίσει τη σταδιοποίηση του καρκίνου του θυρεοειδή σύμφωνα με το σύστημα κατάταξης TNM (Tumor, Node, Metastasis). Ο καρκίνος του θυρεοειδούς κατατάσσεται επιπλέον στα στάδια από I έως IV. Σε αντίθεση με τους περισσότερους καρκίνους, οι καρκίνοι του θυρεοειδούς ομαδοποιούνται σε στάδια στα οποία λαμβάνεται υπόψη ο υπότυπος του καρκίνου και η ηλικία του ασθενούς. Αναλυτικά τα στάδια του θυρεοειδή καρκίνου είναι τα παρακάτω (24) :

- **Θηλώδης και θηλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς για ασθενείς <45 ετών**

Στάδιο I : το θηλώδες καρκίνωμα εντοπίζεται στον θυρεοειδή αδένα

Στάδιο II : το θηλώδες καρκίνωμα έχει εξαπλωθεί σε απόσταση

- **Θηλώδης ή θηλακιώδης καρκίνος του θυρεοειδούς για ασθενείς >45 ετών**

Στάδιο I : το θηλώδες καρκίνωμα εντοπίζεται στον θυρεοειδή αδένα

Στάδιο II : όγκος που είναι >2cm αλλά <4cm και είναι περιορισμένος στον θυρεοειδή αδένα

Στάδιο III : όγκος που είναι >4cm και είναι περιορισμένος στον θυρεοειδή αδένα ή με ελάχιστη εξωθυρεοειδική επέκταση ή θετικοί λεμφαδένες που περιορίζονται στους προτραχειακούς, παρατραχειακούς ή προλαρυγγικούς κόμβους

Στάδιο IV : επέκταση πέραν της θυρεοειδούς κάψουλας στους μαλακούς ιστούς του λαιμού, μεταστάσεις του τραχηλικού λεμφαδένου ή απομακρυσμένες μεταστάσεις. Οι πνεύμονες και τα οστά είναι οι συχνότερες περιοχές διάδοσης

- **Μυελοειδής καρκίνος του θυρεοειδούς**

Στάδιο 0 : κλινικά μη εμφανής ασθένεια που ανιχνεύεται με βιοχημική εξέταση

Στάδιο I : όγκος <2cm

Στάδιο II : όγκος >2cm αλλά <4cm χωρίς μεταστάσεις ή >4cm με ελάχιστη επέκταση εκτός θυρεοειδή

Στάδιο III : όγκος οποιουδήποτε μεγέθους με μετάσταση που περιορίζεται στους προτραχειακούς, παρατραχειακούς ή προλαρυγγικούς λεμφαδένες

Στάδιο IVA : χαμηλό επίπεδο προχωρημένος με ή χωρίς μεταστάσεις στους λεμφαδένες [για T4a], αλλά χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις

Στάδιο IVB : πολύ προχωρημένος με ή χωρίς μεταστάσει στους λεμφαδένες αλλά χωρίς απομακρυσμένες μεταστάσεις

Στάδιο IVC : απομακρυσμένες μεταστάσεις

- **Αναπλαστικός καρκίνος του θυρεοειδούς αδένος**

Όλοι οι ασθενείς θεωρούνται πως βρίσκονται στο στάδιο IV της νόσου.

1.2.4 Μοριακή και κυτταρική γενετική του καρκίνου του θυρεοειδούς

Μοριακές μελέτες έχουν αυξήσει την εκτίμηση της ετερογένειας των θυρεοειδικών νεοπλασμάτων, με την κληρονομική προδιάθεση, τη σωματική μετάλλαξη και την επιγενετική τροποποίηση να συνεισφέρουν στη συμπεριφορά του όγκου. Παρόλα αυτά, αν και υπάρχει ετερογένεια, υπάρχουν αρκετοί μηχανισμοί ογκογένεσης που λαμβάνουν μέρος και έχουν ταυτοποιηθεί σε ποικίλους τύπους καρκίνου του θυρεοειδούς.

Οι θυρεοειδικοί καρκίνοι έχουν αναγνωριστεί από καιρό ως εξαιρετικά αγγειακοί όγκοι, και στους διαφοροποιημένους όγκους η αγγείωση έχει συσχετιστεί με τη συνολική επιβίωση απουσία της νόσου. Ο αγγειακός ενδοθηλιακός αυξητικός παράγοντας (VEGF) και οι σχετιζόμενες κινάσες τυροσίνης ειδικές για τον υποδοχέα του VEGF έχουν εμπλακεί ως σημαντικοί μοριακοί μεσολαβητές της νεο-αγγείωσης του όγκου (28). Προκλινικές δοκιμές έχουν δείξει ότι τα θυρεοειδικά νεοπλάσματα έχουν αυξημένη έκφραση του VEGF σε σχέση με τον φυσιολογικό ιστό. Επίσης τα επίπεδα του VEGF στον ορό έχει δείχθει ότι είναι ανεβασμένα σε ασθενείς με μεταστατικό διαφοροποιημένο καρκίνωμα του θυρεοειδούς σε σχέση με τα φυσιολογικά και η έκφραση του VEGF έχει συσχετιστεί καρκινικό κυτταρικό πολλαπλασιασμό στο θηλώδες και θυλακιώδες καρκίνωμα καθώς και πιο σύντομη επιβίωση χωρίς εξέλιξη του θηλώδους καρκίνου του θυρεοειδούς.

Τα πιο σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται στον καρκίνο του θυρεοειδούς είναι τα RAS/RAF/MEK/ERK μονοπάτι (MAPK σηματοδοτικό μονοπάτι) και το PI3K/Akt/mTOR σηματοδοτικό μονοπάτι. Αυτοί οι οδοί είναι στενά

συσχετιζόμενοι με την επαγωγή της κυτταρικής επιβίωσης, την εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου, την μετανάστευση, τον πολλαπλασιασμό, τον μεταβολισμό, την ογκογένεση και την αγγειογένεση. Παρακάτω θα αναπτυχθούν κάποιες από τις ανωμαλίες που έχουν βρεθεί σε αυτά τα 2 μονοπάτια στον καρκίνο του θυρεοειδούς.

Το RET είναι ένα πρωτο-ογκογονίδιο το οποίο ενεργοποιεί. Οι μεταλλάξεις που περιλαμβάνουν το RET γονίδιο φαίνεται να είναι η κυρίαρχη γενετική ανωμαλία σε όλους σχεδόν του κληρονομικούς μυελοειδείς καρκίνους του θυρεοειδούς. Η ενεργοποίηση του πρωτο-ογκογονιδίου RET έχει ως αποτέλεσμα την συνεχή ενεργοποίηση του MAPK μονοπατιού, προάγοντας την ογκογένεση. Σε άτομα με κληρονομικά σύνδρομα μυελοειδή καρκίνου, όπως είναι η πολλαπλή ενδοκρινής νεοπλασία τύπου 2a ή 2b (MEN2a ή MEN2b) ή οικογενή μυελοειδή καρκίνο, το 96% περίπου των οικογενειών τους θα έχουν ταυτοποιημένες μεταλλάξεις στη γαμετική σειρά στο γονίδιο RET. Η συχνότητα των μεταλλάξεων του RET στον σποραδικό μυελοειδή καρκίνο αναφέρεται ότι κυμαίνεται ανάμεσα στο 25% με 50%. Το RET έχει συσχετιστεί και με την παθογένεση του διαφοροποιημένου καρκίνου του θυρεοειδούς. Αν και το RET εκφράζεται φυσιολογικά μόνο σε κύτταρα νευρικής προέλευσης, συμπεριλαμβάνοντας τα θυρεοειδικά C κύτταρα, μετατοπίσεις του RET και του PTC (ανακατατάξεις RET/PTC) έχουν βρεθεί στο 3-60% των θηλώδων καρκίνων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την έκφραση του ενεργοποιημένου RET και την καθοδική ενεργοποίηση του MEK/ERK. Έχουν αναφερθεί τουλάχιστον 15 γνωστές μετατοπίσεις του RET/PTC που έχουν καταγραφεί στους θηλώδεις καρκίνους. Προκλινικές δοκιμές έχουν επιβεβαιώσει την ογκογένεση που προκαλούν αυτές οι μετατοπίσεις σε κυτταρικές καλλιέργειες θηλώδους θυρεοειδικού καρκίνου καθώς και σε μοντέλα ποντικών (28).

Η οικογένεια πρωτεϊνών Raf παίζει μια βασική λειτουργία πύλης στη μετάδοση σημάτων από υποδοχείς κυτταρικής μεμβράνης σε παράγοντες πυρηνικής μεταγραφής. Μεταλλάξεις στο BRAF γονίδιο είναι οι πιο κοινές μεταλλάξεις που έχουν περιγραφεί στον διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς, με ποσοστά παρατήρησης 36-69% των καρκίνων. Η πιο κοινή μετάλλαξη έχει ως αποτέλεσμα την αντικατάσταση ενός μονού γλουταμινικού οξέος με βαλίνη στην πρωτεΐνη B-Raf, ενώ άλλες ενεργοποιητικές μεταλλάξεις έχουν αναφερθεί ως σπάνιες. Η μετάλλαξη BRAF V600E είναι

χαρακτηριστική για του θηλώδεις καρκίνου αλλά έχει επίσης βρεθεί σε ασθενείς με αδιαφοροποίητο αλλά και αναπλαστικό θυρεοειδικό καρκίνο.

Μεταλλάξεις στις Ras πρωτεΐνες έχουν χαρτογραφηθεί σε μεγάλο ποσοστό σε ασθενείς με θυρεοειδή καρκίνο, με χαρακτηριστική ανωμαλία να είναι μια τυπική σημειακή μετάλλαξη ενεργοποίησης. Το 20% με 50% όλων των ασθενών με θηλακιδώδη αδενώματα ή καρκίνωματα έχουν σημειακές μεταλλάξεις στο κωδικόνιο 61 του γονιδίου RAS, περίπου 0-15% των ασθενών με θηλώδη καρκίνο μοιράζονται αυτή τη μετάλλαξη. Σε πειράματα *in vitro* που έχουν πραγματοποιηθεί, και έχει γίνει ενεργοποίηση του RAS σε κυτταρική σειρά θυροκυττάρων έχει συσχετιστεί με αυξημένο πολλαπλασιασμό και μειωμένη έκφραση γονιδίων που εκφράζονται συγκεκριμένα στα θηλακιδώδη κύτταρα (28, Portella et al. 1999; Monaco et al. 1995). Η ενεργοποίηση του RAS έχει κλινικά συσχετιστεί με πιο επιθετικό φαινότυπο διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς. Εμφάνιση του RAS επίσης υπάρχει σε κλινικά σημαντικό βαθμό σε υποσύνολα ασθενών με μυελοειδή καρκίνο

1.2.5 Θεραπεία καρκίνου του θυρεοειδούς

Οι θεραπευτικές επιλογές που υπάρχουν στον θυρεοειδή καρκίνο περιλαμβάνουν εγχείρηση, θεραπεία με ραδιενεργό ιώδιο (^{131}I) και μοριακά στοχευμένες θεραπείες με αρκετούς αναστολείς κινάσης (TKIs). Η επιλογή θεραπείας ποικίλει ανάλογα με τον τύπο και το στάδιο του καρκίνου.

- Η επιλογή της εγχείρησης περιλαμβάνει τη λοβεκτομή (αφαίρεση του πάσχοντα λοβού και ισθμού), τη σχεδόν ολική θυρεοειδεκτομή (αφαίρεση των δύο λοβών και του ισθμού αφήνοντας υπόλειμμα 10%, <2g, στον αντίθετο από τον περιέχοντα τον καρκινικό λοβό) και την ολική θυρεοειδεκτομή (αφαίρεση των δύο λοβών και του ισθμού). Συνολικά η σχεδόν ολική ή ολική θυρεοειδεκτομή συνίσταται για τη διαχείριση πρωτοπωθών όγκων με μέγεθος >1.0 cm με 2.0cm. Εξαιτίας του υψηλού ποσοστού (42.7%) της πολιεστιακής κατανομής του θυρεοειδικού καρκίνου, η αφαίρεση του θυρεοειδή αδένα στο σύνολό του μειώνει την πιθανότητα κακοήθειας στο υπολειμματικό παρέγχυμα. Η θυρεοειδεκτομή συνίσταται επίσης επειδή το 5% με 10% των θυρεοειδικών καρκινικών υποτροπών βρίσκονται στον αντίθετο λοβό.
- Το ^{131}I έχει σημαντικό ρόλο στη θεραπεία και τη διαχείριση του καρκίνου του θυρεοειδούς από το 1946. Χρησιμοποιείται σε συντονισμό με την θυρεοειδεκτομή για την πλήρη εξάλειψη του θυρεοειδούς αδένα και την μετεγχειρητική εξάλειψη πιθανού υπολειπόμενου καρκίνου. Το ^{131}I εισέρχεται στα θυρεοειδή κύτταρα μέσω των μεταφορέων ιωδίου-νατρίου και εκπέμποντας β- ακτίνοβολία μήκους κύματος προκαλεί έτσι τον οξύ θάνατο των κυττάρων. Όταν χορηγείται για πρώτη φορά μετά τη χειρουργική επέμβαση, αναφέρεται ως αφαίρεση, ενώ οι επόμενες χορηγήσεις για υπολειπόμενη ασθένεια αναφέρονται ως θεραπεία. Η αφαίρεση του εναπομείναντα ιστού χρησιμεύει για τη μείωση της πιθανότητας υποτροπής και επίσης για την αύξηση της ευαισθησίας των διαγνωστικών εξετάσεων παρακολούθησης (π.χ. σπινθηρογράφημα σπινθηρογραφίας ολόκληρου του σώματος και επίπεδα θυρεοσφαιρίνης ορού) που διευκολύνουν την ανίχνευση μεταστατικής ή υπολειμματικής

νόσου. Είναι ιδιαίτερα χρήσιμο για τον διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς, επειδή αντιπροσωπεύει την πλειοψηφία των καρκίνων του θυρεοειδούς και σχετίζεται με 10ετή ποσοστό επιβίωσης μεταξύ 90% και 95%. Αυτό το ποσοστό επιβίωσης υποδηλώνει την ανάγκη μακροπρόθεσμης παρακολούθησης και δοκιμών για επανάληψη. Αν και έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως ως ανοσοενισχυτική θεραπεία, η θεραπεία με ^{131}I παραμένει επίσης η βασική θεραπεία για μη χειρουργήσιμους και ελλιπώς ανιχνεύσιμους όγκους θυρεοειδούς, όπως μικροσκοπικές ή μεταστατικές ασθένειες. Αρκετοί παράγοντες θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την έναρξη ασθενούς με θεραπεία με ^{131}I . Ο πρώτος παράγοντας που πρέπει να ληφθεί υπόψη είναι η λειτουργικότητα, επειδή η χειρουργική επέμβαση είναι η θεραπεία πρώτης γραμμής για τους διαφοροποιημένους καρκίνους. Επιπροσθέτως, είναι σημαντικό να εκτιμηθεί η ιριδιζουσα οξύτητα των ιστών, επειδή το ^{131}I πρέπει να μεταφερθεί στον ιστό ώστε να έχει αποτέλεσμα. Η θέση της νόσου και τα χαρακτηριστικά του όγκου είναι σημαντικοί παράγοντες που πρέπει να σημειωθούν, επειδή επηρεάζουν τα αποτελέσματα της θεραπείας με ^{131}I , όπως φαίνεται από τα υψηλότερα ποσοστά θεραπείας με μεταστάσεις πνευμόνων και μαλακών μορίων και με καλά διαφοροποιημένους ιστοτύπους όγκων σε αντίθεση με τις εγκεφαλικές μεταστάσεις και κακώς διαφοροποιημένους όγκους.

- Η ραδιενεργός θεραπεία με ιώδιο είναι η βασική θεραπεία για υποτροπιάζοντα ή μεταστατικό καρκίνο του θυρεοειδούς. Ωστόσο, σε ασθενείς των οποίων ο καρκίνος δεν ανταποκρίνεται πλέον στο ιώδιο, απαιτείται άλλη επιλογή θεραπείας. Έχουν ταυτοποιηθεί πολλές γενετικές αλλοιώσεις που περιλαμβάνουν οδούς σηματοδότησης κινάσης τυροσίνης, συμπεριλαμβανομένων των γονιδίων πρωτεϊνικής κινάσης RET, RAF ή RAS, οι οποίες οδηγούν στην ενεργοποίηση της περιοχής κινάσης τυροσίνης. Η οδός RET / RAS / RAF αλληλοσυνδέεται με τον καταρράκτη που ενεργοποιείται από τον υποδοχέα του επιδερμικού αυξητικού παράγοντα, ο οποίος οδηγεί στη συνθήκη του αγγειακού

ενδοθηλιακού αυξητικού παράγοντα (VEGF) και του υποδοχέα VEGF. Οι μεταλλάξεις κέρδους λειτουργίας στο ογκογονίδιο BRAF, οι οποίες προσδίδουν νέα ή ενισχυμένη δραστηριότητα σε μια πρωτεΐνη, είναι οι συχνότερες γενετικές αλλοιώσεις που εμφανίζονται σε ασθενείς με θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς, που εμφανίζονται σε περίπου 45% έως 70% αυτών των όγκων σε ενήλικες. Η υπερέκφραση του VEGF και άλλων αυξητικών παραγόντων βρίσκεται συχνά σε όγκους που προέρχονται από τον θυρεοειδή, ιδιαίτερα σε όγκους με BRAF μεταλλάξεις. Τα φάρμακα που στοχεύουν αυτές τις οδούς θα μπορούσαν να διαδραματίσουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της εξέλιξης της νόσου. Αυτή τη στιγμή είναι εγκεκριμένοι από τον FDA 3 αναστολείς της κινάσης της τυροσίνης οι οποίοι χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση του καρκίνου του θυρεοειδούς. Αρχικά, το 2011 ο FDA ενέκρινε το vandetanib το οποίο στοχεύει τους υποδοχείς RET, EGFR και VEGF για θεραπεία ασθενών με συμπτωματικό ή προοδευτικό, μη ανιχνεύσιμο, τοπικά προχωρημένο ή μεταστατικό μυελοειδή καρκίνο του θυρεοειδούς. Η έγκριση του φαρμάκου αυτού έγινε μετά από έρευνα από την οποία προέκυψαν δεδομένα για σημαντική παράταση της επιβίωσης χωρίς εξέλιξη της νόσου με το vandetanib έναντι του placebo. Την επόμενη χρονιά, το 2012, εγκρίθηκε ο δεύτερος αναστολέας κινάσης τυροσίνης για τις ίδιες ενδείξεις με το vandetanib. Το φάρμακο αυτό στοχεύει 3 δυνητικά σημαντικά σηματοδοτικά μονοπάτια στον μυελοειδή θυρεοειδικό καρκίνο : το MET, τον υποδοχέα 2 του VEGF και το RET. Η έρευνα στην οποία πραγματοποιήθηκαν κλινικοί έλεγχοι για το φάρμακο, έδειξε παράταση ζωής 11.2 μήνες έναντι του placebo που ήταν 4 μήνες. Το 2013, το sorafenib, το οποίο είναι μια ένας πολλαπλός αναστολέας κινάσης του RET, του φυσιολογικού και μεταλλαγμένου BRAF V600E, και των υποδοχέων 2 και 3 του VEGF, μεταξύ άλλων ήταν το τρίτο φάρμακο που έλαβε την έγκριση από τον FDA για τη θεραπεία του ¹³¹I-ανθεκτικού, τοπικά υποτροπικό ή μεταστατικό, προοδευτικού, διαφοροποιημένου καρκίνου του θυρεοειδούς.

Για να υπάρχει διαχείριση μετά την εκάστοτε θεραπεία που θα ακολουθήσει ο κάθε ασθενής, προτείνεται θεραπεία καταστολής της TSH. Η θεραπεία συνιστάται μετά από χειρουργική επέμβαση και μετά από θεραπεία με ^{131}I , επειδή οι διαφοροποιημένοι καρκίνοι του θυρεοειδούς εκφράζουν υποδοχείς TSH που ανταποκρίνονται στην διέγερση της TSH. Τα κύτταρα ανταποκρίνονται αυξάνοντας τους μεταφορείς ιωδίου-νατρίου και αυξάνοντας έτσι την ανάπτυξη των κυττάρων. Η καταστολή της TSH μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση υπερφυσιολογικών δόσεων λεβοθυροξίνης για την καταστολή της TSH σε $<0,1 \text{ mU} / \text{L}$ ή έως $0,5 \text{ mU} / \text{L}$ για ασθενείς με χαμηλότερο κίνδυνο. Η θυρεοσφαιρίνη ορού πρέπει να μετράται κάθε 6 έως 12 μήνες στο ίδιο εργαστήριο μαζί με αντισώματα αντιθυροσφαιρίνης, επειδή το 25% των ασθενών με καρκίνο του θυρεοειδούς θα παράγει αυτό το αντίσωμα, το οποίο μειώνει ψευδώς το επίπεδο της θυρεοσφαιρίνης στον ορό. Το περιοδικό υπερηχογράφημα του τραχήλου θα πρέπει επίσης να διεξάγεται σε ασθενείς με μερική θυροειδεκτομή και σε ασθενείς με ολική θυροειδεκτομή που δεν έχουν υποβληθεί σε απομάκρυνση ^{131}I για παρακολούθηση της ανάπτυξης ιστών.

1.3 Οικογένεια πρωτεϊνών των S κινασών

1.3.1 Ο ρόλος των RSK κινασών στον καρκίνο

Το μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK ή αλλιώς MAPK μονοπάτι είναι συχνά ενεργό μη φυσιολογικά σε πολλά είδη καρκίνου και είναι υπεύθυνο για χαμηλή πρόγνωση και αντοχή στις χημειοθεραπείες. Οι S6 ριβοσωμικές κινάσες 90-kDa (RSK1-4) είναι μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών σερίνης/θρεονίνης που αποτελούν τους καθοδικούς τελεστές αυτού του μονοπατιού και φωσφορυλιώνουν υποστρώματα που εμπλέκονται στη μεταγραφή, τη μετάφραση, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την κυτταρική επιβίωση. Οι RSK κινάσες έχουν μεγάλο ποσοστό ομολογίας στην αλληλουχία (73-

80%), αλλά το περισσότερο που διαφέρουν είναι στις αμινο- και καρβοξυ- τελικές περιοχές τους. Και οι τέσσερις ισομορφές των RSK κινασών αποτελούνται από δύο λειτουργικά διακριτές μονάδες κινασών (μια αμινοτελική δομή κινάσης και μια καρβοξυτελική δομή κινάσης) που ενώνονται μέσω μιας ρυθμιστικής περιοχής σύνδεσης. Η ενεργοποίηση των RSK απαιτεί διαδοχική φωσφορυλίωση από τον ERK1/2 στην καρβοξυτελική δομή, αυτοφωσφορυλίωση της περιοχής σύνδεσης και φωσφορυλίωση μεσολαβούμενη από την PDK1(3-φωσφοϊνσιτιδο-εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση) στην αμινοτελική περιοχή. Αρκετοί ολικοί αναστολείς των RSK έχουν αναφερθεί, συμπεριλαμβανομένων τους SL0101, BI-D1870, BIX 02565, LJH685, και LJ1308 οι οποίοι δρουν ως ανταγωνιστές αναστολείς στο σημείο πρόσδεσης του ATP στην αμινοτελική περιοχή και τον FMK ο οποίος προσδένεται μη αντιστρεπτά σε μια περιοχή κυστεΐνης στο σημείο πρόσδεσης του ATP στην καρβοξυτελική περιοχή των RSK1, RSK2 και RSK4. Κανένας από τους υπάρχοντες αναστολείς δεν εμφανίζει εκλεκτικότητα για κάποια συγκεκριμένη ισομορφή RSK, κάτι το οποίο μπορεί να έχει αποτέλεσμα σε αντιφατικές αντι- και προκαρκινικές επιπτώσεις. Για τον λόγο αυτό ένας σημαντικός στόχος των μελλοντικών ερευνών είναι να αναπτυχθούν αναστολείς RSK που είναι εκλεκτικοί στην ισομορφή για να βοηθήσουν στην αναγνώριση των RSK υποστρωμάτων και να εκτιμηθεί ο ρόλος των RSK ισομορφών στον καρκίνο και της αναστολής των RSK ως αντικαρκινική θεραπεία.

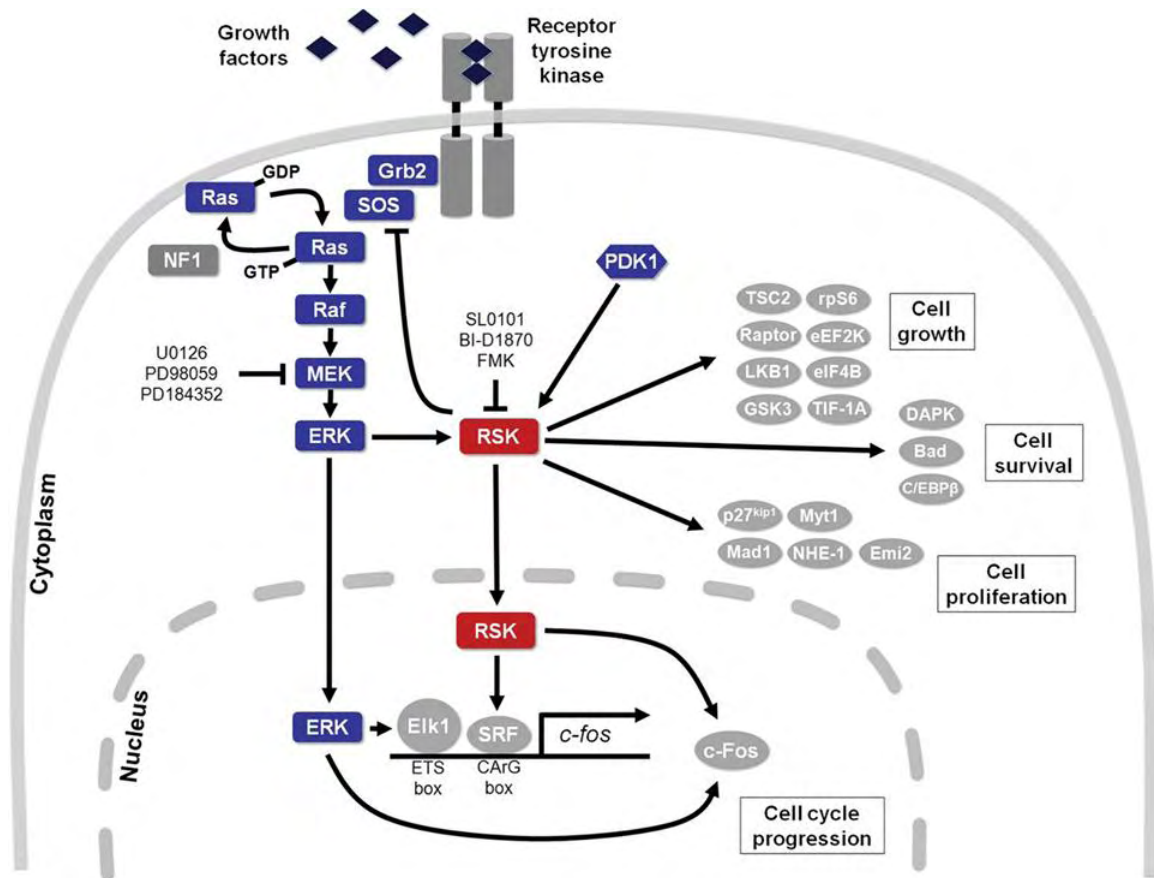
1.3.2 Το μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK

Το σηματοδοτικό μονοπάτι MAPK έχει θεμελιώδη ρόλο στη ρύθμιση του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και της επιβίωσης καθώς και στην ογκογένεση στον άνθρωπο. Η σημασία αυτού του μονοπατιού έχει εγκαθιδρυθεί καλά στην θυρεοειδική ογκογένεση, ειδικά για τον θηλώδη καρκίνο του θυρεοειδούς (PTC). Στον καρκίνο του θυρεοειδούς, το MAPK μονοπάτι καθοδηγείται από ενεργοποιητικές μεταλλάξεις, συμπεριλαμβάνοντας μεταλλάξεις όπως οι BRAF και RAS, από RET-PTC και, σε μερικές περιπτώσεις, από τις πρόσφατα ανακαλυφθείσες μεταλλάξεις ALK.

Η ογκογένεση του θυρεοειδούς μεσολαβούμενη από το MAPK περιλαμβάνει ευρεία ποικιλία δευτερευόντων μοριακών αλλαγών που συνεργάζονται και αυξάνουν την ογκογενετική δραστηριότητα αυτού του μονοπατιού, όπως είναι η υπερμεθυλίωση σε όλο το γονιδίωμα και η υπομεθυλίωση. Επιπρόσθετα, μπορεί να συμβεί θετική ρύθμιση καθιερωμένων ογκογενετικών πρωτεϊνών.

Το μονοπάτι Ras/Raf/MEK/ERK μπορεί να ενεργοποιηθεί μέσω διέγερσης που μεσολαβείται από αυξητικό παράγοντα στους υποδοχείς κινάσης τυροσίνης, όπως είναι ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor). Η ενεργοποίηση του υποδοχέα κυτταρικής επιφάνειας έχει ως αποτέλεσμα αυξημένη αυτοφωσφορυλίωση κινάσης τυροσίνης και δημιουργεί θέσεις πρόσδεσης για πρωτεΐνη GRB2 (growth factor receptor-bound protein-2), η οποία συνδέει τον υποδοχέα με τον παράγοντα ανταλλαγής νουκλεοτιδίων γουανίνης (SOS). Το SOS καταλύει τη δέσμευση GTP στην οικογένεια Ras των GTPασών (KRAS, NRAS και HRAS) και η συνδεδεμένη με GTP μορφή του Ras συνδέεται και ενεργοποιεί τις κινάσες τελεστές του Raf, μια οικογένεια πρωτεϊνικών κινασών (BRAF, CRAF και ARAF) που εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη. Ο Raf φωσφορυλιώνει και ενεργοποιεί τις MAPK και MAPK κινάση 1 και 2 (MAP2K1 / 2, επίσης γνωστές ως MEK1 / 2), τα κυρίαρχα υποστρώματα του Raf. Οι ενεργοποιημένες MEK1 / 2 στη συνέχεια φωσφορυλιώνουν και ενεργοποιούν τις εξωκυτταρικές κινάσες 1 και 2 που ρυθμίζονται από το σήμα (ERK1 / 2). Οι RSKs φωσφορυλιώνονται άμεσα και ενεργοποιούνται διαδοχικά με τις ERK1 / 2 και PDK1, μία συστατικά δραστική Ser / Thr κινάση. Σε αντίθεση με το μονοπάτι PI3K / PTEN / Akt, το οποίο απαιτεί σηματοδότηση του PI3K για εξαρτώμενη από PDK-1 ενεργοποίηση του Akt, δεν απαιτείται ενεργοποίηση PI3K για ενεργοποίηση των RSK με τη μεσολάβηση PDK-1. Η ενεργοποιημένη RSK μπορεί να παραμείνει συνδεδεμένη με τη μεμβράνη, να διαχυθεί εντός του κυτοσολίου ή να μετατοπιστεί στον πυρήνα, οπότε να φωσφορυλιωθούν υποστρώματα σε όλο το κύτταρο. Αυτός ο καταρράκτης σηματοδότησης, από το Ras έως την RSK, συνδυάζει τα σήματα από τους υποδοχείς της κυτταρικής επιφάνειας με τους παράγοντες μεταγραφής και άλλες πρωτεΐνες που ρυθμίζουν βασικές κυτταρικές διεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου, της διαφοροποίησης, της επιβίωσης, του πολλαπλασιασμού, του

μεταβολισμού, της μετανάστευσης και της εισβολής. Η υπερδραστηριότητα της οδού Ras / Raf / MEK / ERK με αυξημένες μεταλλάξεις διέγερσης ή κέρδους-λειτουργίας διευκολύνει την ανάπτυξη και την επιβίωση πολλών καρκίνων του ανθρώπου . επομένως, η στόχευση των προς τα κάτω τελεστών αυτής της οδού θεωρείται ελκυστική αντικαρκινική στρατηγική.



Εικόνα 5: Η οδός Ras / MAPK οδηγεί στην ενεργοποίηση της οικογένειας πρωτεϊνών κινάσης RSK. *Romeo et al., 2012*

1.3.3 Φωσφορυλίωση και ενεργοποίηση των S κινασών

Στους ανθρώπους, τέσσερις ισομορφές (RSK1-4) και δύο δομικά σχετιζόμενα ομόλογα, γνωστά ως κινάσες ενεργοποιούμενες από μιτογόνο και στρες 1 και 2 [mitogen- and stress-activated kinases 1 and 2 (MSK1/2)] έχουν ταυτοποιηθεί. Οι RSKs έχουν δυο λειτουργικά διακριτές δομές κινάσης, μια αμινοτελική και μια καρβοξυτελική, που είναι συνδεδεμένες με μια συντηρημένη περιοχή σύνδεσης. Η καρβοξυτελική περιοχή εμπλέκεται στην αυτοφωσφορυλίωση των RSK και είναι ομόλογη με τις πρωτεϊνικές κινάσες που είναι ασβέστιο/καλμοδουλίνη- εξαρτώμενες, ενώ η αμινοτελική περιοχή μοιράζεται ομολογία με την οικογένεια των AGC κινασών και είναι υπεύθυνη για τη φωσφορυλίωση του υποστρώματος RSK. Παρά το γεγονός ότι οι RSKs έχουν υψηλό βαθμό ομολογίας στην αλληλουχία τους (73-80% αμινοξική ταυτότητα), συγκεκριμένα στις δομές κινάσης (78-90%), υπάρχει αυξανόμενη ένδειξη ότι η ειδικότητα ισομορφής ανάμεσα στις RSKs μεσολαβεί στις διάφορες κυτταρικές διαδικασίες.

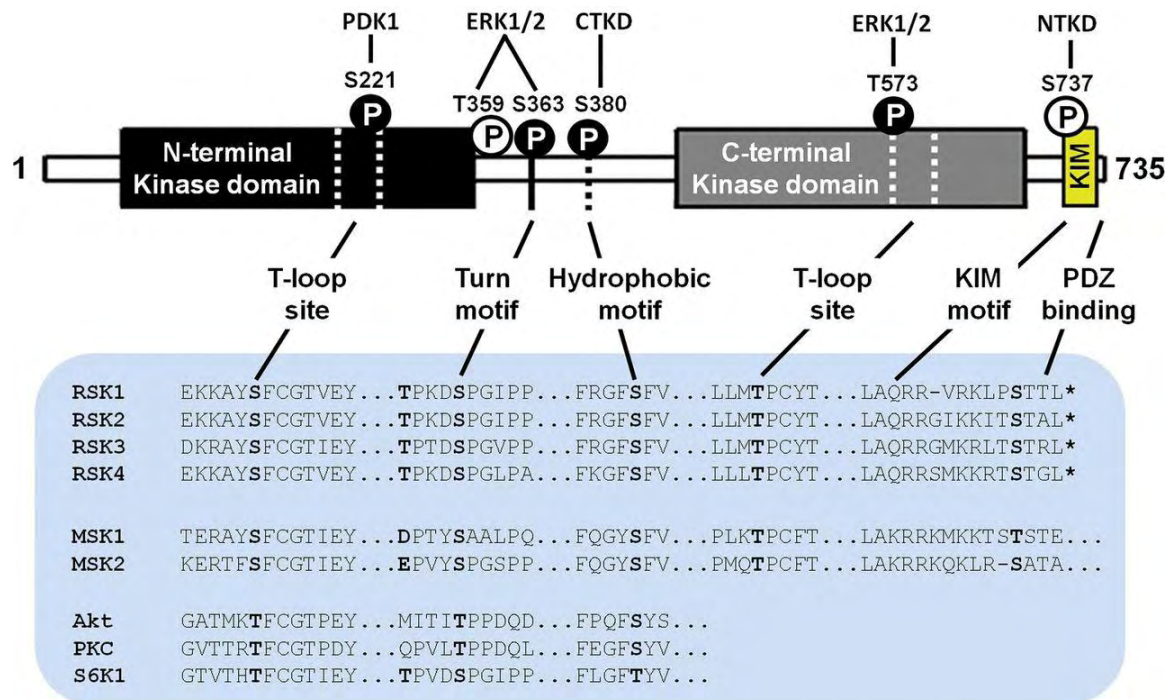
Στα κύτταρα που βρίσκονται σε ηρεμία, οι μη ενεργές ισομορφές RSK1-3 εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα σε σύμπλεγμα με τον ανοδικό αυξητικό παράγοντα ERK1/2. Ακολουθώντας τη διέγερση από τον αυξητικό παράγοντα, οι RSKs συσσωρεύονται στην μεμβράνη του πλάσματος, όπου είναι φωσφορυλιωμένες και ενεργοποιημένες, προωθώντας μετατόπιση στον κυτταρόπλασμα και τον πυρήνα. Η ικανότητα των RSKs να εισέρχονται στον πυρήνα έχει προταθεί ότι συσχετίζεται με ένα υποτιθέμενο σήμα πυρηνικού εντοπισμού στο άκρο του C. Η RSK4 είναι διακριτή από τις άλλες RSK ισομορφές στο γεγονός ότι είναι κυρίως κυτταροπλασματική, συνεχώς ενεργή και εμφανίζει δραστηριότητα κινάσης ανεξάρτητη από αυξητικό παράγοντα. Ο προσδιορισμός των εξειδικευμένων μηχανισμών ενεργοποίησης των RSK αποτελεί ιδιαίτερη πρόκληση εξαιτίας των πολλαπλών περιοχών φωσφορυλίωσης στις RSK, την έκφραση και ρύθμιση των τεσσάρων RSK ισομορφών όπως επίσης και της μετατόπισης της κυτταρικής τους θέσης. Έχουν ταυτοποιηθεί συνολικά έξι περιοχές φωσφορυλίωσης στην RSK1 και 2 (που είναι επίσης συντηρημένες και στις RSK3 και RSK4) και, από αυτές, η Ser211 στον βρόγχο ενεργοποίησης της αμινοτελικής περιοχής, οι Ser363 και Ser380 στη συνδετική περιοχή και η Thr573 στον βρόγχο ενεργοποίησης του καρβοξυτελικού άκρου είναι σημαντικές για τη δραστηριότητα (η αμινοξική αρίθμηση

αφορά την RSK1). Ο γενικός διαδοχικός μηχανισμός ενεργοποίησης των RSK περιλαμβάνει τη δέσμευση αδρανούς ERK1 / 2 σε ένα ειδικό μοτίβο σύνδεσης ERK (Leu-Arg-Gln-Arg-Arg) της επικράτειας D στο καρβοξυτελικό άκρο των RSKs. Μετά την ενεργοποίηση, το ERK1 / 2 φωσφορυλιώνει τη Thr573 στον βρόχο ενεργοποίησης του RSK στο καρβοξυτελικό άκρο (CTKD) και μπορεί επίσης να φωσφορυλιώσει τη Ser363 και Thr359 στην περιοχή σύνδεσης, με αποτέλεσμα τη διάσπαση του συμπλέγματος ERK1 / 2-RSK. Η φωσφορυλίωση της Thr573 καταλήγει σε ενεργοποίηση της καρβοξυτελικής περιοχής (CTKD) και αυτοφωσφορυλίωση της Ser380, προωθώντας την πρόσληψη PDK1 στην περιοχή σύνδεσης. Η PDK1 στη συνέχεια φωσφορυλιώνει τη Ser211 στο αμινοτελικό άκρο (NTKD), οδηγώντας στην πλήρη ενεργοποίηση του RSK και στη μετέπειτα φωσφορυλίωση των κυτταροπλασματικών ή πυρηνικών υποστρωμάτων στο αμινοτελικό άκρο (NTKD). Εναλλακτικοί μηχανισμοί ενεργοποίησης RSK έχουν αναφερθεί και περιλαμβάνουν φωσφορυλίωση του καρβοξυτελικού άκρου (CTKD) του RSK με τη μεσολάβηση των p38 MAPK και ERK5, φωσφορυλίωση του RSK2 στην Tyr529 με τον παράγοντα ανάπτυξης ινοβλαστών 3 (FGFR3) και το Src που διευκολύνει τη σύνδεση του ERK1 / 2 με RSK2. Η αποφωσφορυλίωση των RSKs από πρωτεϊνικές φωσφατάσες πιστεύεται ότι προκαλεί την αδρανοποίησή τους.

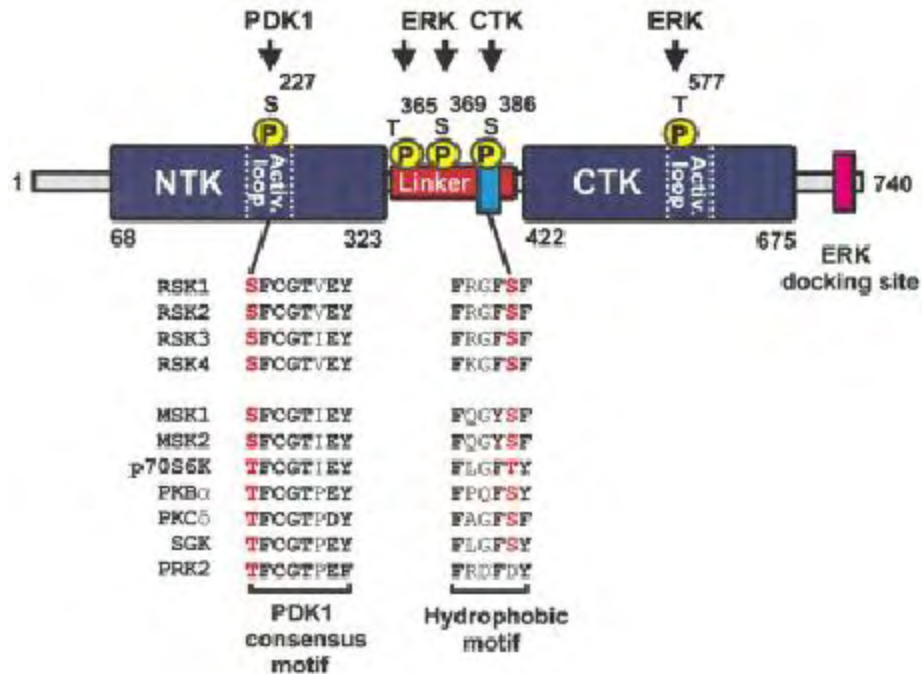
1.3.4 Δομή και κυτταρικός εντοπισμός των S κινασών

Η ταυτοποίηση των υποστρωμάτων RSK είναι ένα πεδίο ενεργής εξερεύνησης για την κατανόηση των μηχανισμών με τους οποίους οι ισομορφές RSK ασκούν τις επιπτώσεις τους σε διάφορες βιολογικές διεργασίες. Η εξειδίκευση του υποστρώματος της RSK1 έχει εξετασθεί χρησιμοποιώντας συνθετικές πεπτιδικές βιβλιοθήκες που πιστοποιήσαν ένα ελάχιστο συναινετικό μοτίβο φωσφορυλίωσης Arg / Lys-X-Arg-X-X-pSer / Thr ή Arg-Arg-X-pSer / Thr. Οι RSKs έχουν τη δυνατότητα φωσφορυλίωσης υποστρωμάτων σε διαφορετικά υποκυτταρικά διαμερίσματα, συμπεριλαμβανομένης της μεμβράνης του πλάσματος, του κυτταροπλάσματος και του πυρήνα, υποδεικνύοντας ότι τα διάφορα μέλη της οικογένειας μπορούν να ρυθμίζουν την πρωτεϊνική δραστηριότητα σε όλο το

κύτταρο. Δεδομένα από διάφορες μελέτες που έχουν χρησιμοποιήσει τεχνολογία RNAi και αναστολείς μικρών μορίων υποστηρίζουν τη φωσφορυλίωση από RSKs μιας σειράς υποστρωμάτων που εμπλέκονται στη μεταγραφή, τη μετάφραση, τη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου και την κυτταρική επιβίωση.



Εικόνα 6: Σχηματική απεικόνιση του RSK1 με τους κύριους λειτουργικούς τομείς. Η RSK χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο λειτουργικών περιοχών, του NTKD και του CTKD, οι οποίες συνδέονται με μία περιοχή πρόσδεσης περίπου 100 αα. Η ενεργοποίηση της RSK συσχετίζεται με αυξημένη φωσφορυλίωση σε έξι θέσεις (καθεμία εμφανίζεται ως μαύροι ή λευκοί κύκλοι). Αυτές οι θέσεις φωσφορυλίωσης είναι εξαιρετικά συντηρημένες σε RSK1-4 και αποδείχθηκαν είτε απαραίτητες (μαύροι κύκλοι) είτε βοηθητικοί (λευκοί κύκλοι) για ενεργοποίηση RSK. Το καρβοξυτελικό άκρο της πρωτεΐνης περιέχει μια περιοχή πρόσδεσης ERK1 / 2 που μοιάζει με ένα μοτίβο KIM και το ακραίο Ο-άκρο περιλαμβάνει ένα μοτίβο σύνδεσης PDZ. Η αρίθμηση αμινοξέων αναφέρεται σε ανθρώπινο RSK1.



Εικόνα 7: Δομή και ρυθμιστικές θέσεις φωσφορυλίωσης του RSK2.

Η RSK αποτελείται από δύο περιοχές κινάσης που συνδέονται με μία περιοχή ρυθμιστικού συνδέτη. Η καρβοξυτελική ουρά περιέχει μια θέση σύνδεσης για το ERK (Gavin and Nebreda, 1999, Smith et al., 1999). Οι θέσεις των θέσεων φωσφορυλίωσης και των κινάσεων που φωσφορυλιώνουν αυτές τις θέσεις παρουσιάζονται. Η φωσφορυλίωση σε Ser227, Ser369, Ser386 και Thr577 ρυθμίζει τη δραστηριότητα κινάσης, ενώ ο ρόλος της φωσφορυλίωσης της Thr365 είναι ασαφής (αρίθμηση RSK2 ποντικού). Οι αλληλουχίες αμινοξέων δείχνουν το μοτίβο φωσφορυλίωσης βασιζόμενη στη PDK1 και το υδρόφοβο μοτίβο με συντηρημένα υπολείμματα με έντονους χαρακτήρες. Η ευθυγράμμιση δείχνει ότι και τα δύο μοτίβα υπάρχουν σε πολλές ενεργοποιημένες από αυξητικό παράγοντα κινάσεις, συμπεριλαμβανομένων των RSK, MSK, p70S6K, PKBα, PKC δ, SGK και PRK2. Οι σερίνες / θρεονίνες που απαιτούν φωσφορυλίωση για ενεργοποίηση κινάσης φαίνονται με κόκκινο χρώμα. Οι αλληλουχίες είναι ανθρώπινες, εκτός των RSK1 (αρουραίου), RSK2 και PKC δ (και των δύο ποντικών). Προσαρμογή από: *A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1*, Morten FroEdin et al., 2000

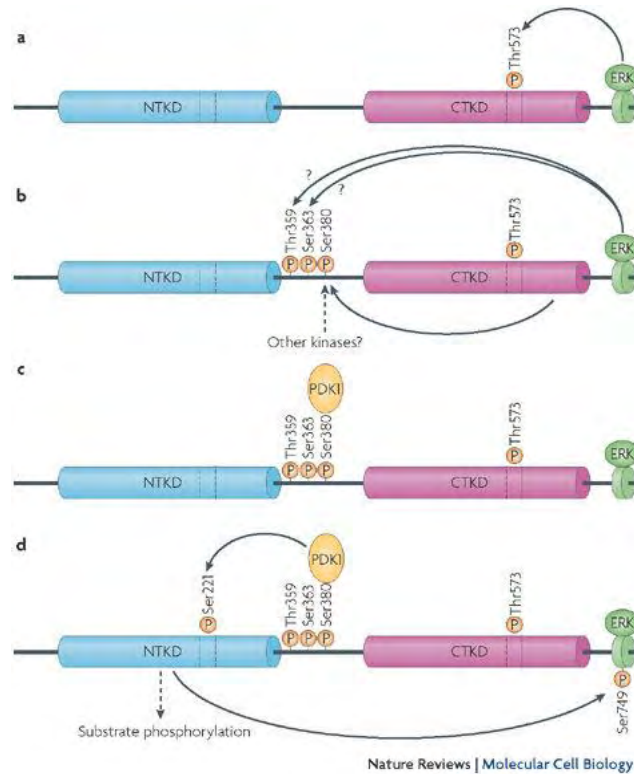
1.3.5 Ενεργοποίηση των RSKs στον καρκίνο

Οι ισομορφές RSK1-4 εκφράζονται ευρέως σε φυσιολογικές κυτταρικές σειρές και ιστούς, αλλά λίγα είναι γνωστά για τις ειδικές και επικαλυπτόμενες λειτουργίες των μεμονωμένων ισομορφών RSK. Οι συνολικές λειτουργικές διαφορές των ισομορφών RSK είναι εμφανείς στον καρκίνο, όπου η έκφραση και η δραστικότητα του RSK1 και / ή του RSK2 προάγουν την ανάπτυξη και την επιβίωση του όγκου, ενώ οι RSK3 και RSK4 έχουν αναφερθεί ότι δρουν αντίστροφα ως καταστολείς όγκων. Η ανώμαλη έκφραση ή / και δραστηριότητα των RSKs έχει συσχετιστεί με διάφορους τύπους καρκίνου, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου του μαστού, του καρκίνου του παχέος εντέρου, του καρκίνου του πλακώδους κυττάρου (HNSCC), της λευχαιμίας, του καρκίνου του πνεύμονα, του κακοήθους μελανώματος, του πολλαπλού μυελώματος, του καρκίνου των ωοθηκών και του καρκίνου του προστάτη. Η θετική ρύθμιση της έκφρασης των RSK1 και RSK2 σε διαφορετικούς τύπους καρκίνου υποδηλώνει ότι εμπλέκονται στην ογκογένεση και θα μπορούσαν να στοχευθούν με αντικαρκινικές θεραπείες. Η έκφραση των RSK1 και RSK2 έχει αναφερθεί ότι είναι αυξημένη σε δείγματα όγκου μαστού και προστάτη και η αναστολή της δραστικότητας RSK έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τον πολλαπλασιασμό σε κυτταρικές σειρές καρκίνου του μαστού και του προστάτη.

Η έκφραση και η ενεργοποίηση των RSKs σε κύτταρα καρκίνου του πνεύμονα αναστέλλει τον κυτταρικό θάνατο μέσω απενεργοποίησης προαποπτωτικών πρωτεϊνών, όπως ο επαγωγέας θανάτου σχετιζόμενος με Bcl-2, BAD (Bcl-2 associated death promoter). Η έκφραση του RSK2, αλλά όχι του RSK1, βρέθηκε να συσχετίζεται με αυξημένη μετάσταση σε ασθενείς με HNSCC. Η απώλεια λειτουργίας του RSK2 οδηγεί σε μειωμένη φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης δέσμευσης στοιχείων κυκλικής AMP (CREB) και Hsp27, τα οποία είναι απαραίτητα για την διαμεσολαβούμενη από RSK2 εισβολή των κυττάρων HNSCC.

Έτσι, ενώ οι λειτουργίες των RSK3 και RSK4 στον καρκίνο δεν έχουν ακόμη καθοριστεί σαφώς, συνολικά, τα RSK1 και RSK2 θεωρούνται γενικά τα κυρίαρχα ισόμορφα που ενισχύουν τον πολλαπλασιασμό του όγκου. Συνεπώς με αυτό, η έκφραση

των RSK1 και RSK2 είναι συχνά υψηλότερη στους όγκους σε σχέση με τους υγιείς ιστούς, ενώ η έκφραση των RSK3 και RSK4 είναι συνήθως χαμηλότερη στους όγκους σε σύγκριση με τους υγιείς ιστούς.



Εικόνα 8: Πρότυπο στρατολόγησης και συντονισμένης ενεργοποίησης των PDK1 και RSK2. Τα κύτταρα σε ηρεμία περιέχουν ένα προσχηματισμένο σύμπλεγμα ανενεργών RSK και ERK. Η διέγερση του Ras - ERK μονοπατιού έχει σαν αποτέλεσμα την καταλυόμενη από την ERK φωσφορυλίωση του συνδέτη και του CTK, οδηγώντας σε αυτοφωσφορυλίωση του RSK2 στο Ser386 στο υδρόφοβο μοτίβο. Η φωσφορυλίωση του Ser386 στο υδρόφοβο μοτίβο δημιουργεί μια θέση πρόσδεσης που επιτρέπει το σχηματισμό συμπλόκου μεταξύ του PDK1 και του RSK2. Η αλληλεπίδραση της PDK1 με το Ser386-φωσφορυλιωμένο υδρόφοβο μοτίβο διεγείρει την δραστικότητα της PDK1 και την αυτοφωσφορυλίωση. Ο συνδυασμός αυξημένης τοπικής συγκέντρωσης και δραστικότητας κινάσης του PDK1 εξασφαλίζει αποτελεσματική φωσφορυλίωση του Ser227, οδηγώντας σε πλήρη ενεργοποίηση του RSK. *A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1*, Morten FroEdin et al., 2000

1.4 Αναστολείς των ριβοσωμικών S κινασών

1.4.1 Αναστολείς των RSK : BI-D1870

Η διϋδροπερδινόνη BI-D1870 είναι ένας ολικός RSK αναστολέας ανταγωνιστικός με ATP, με ένα *in vitro* IC₅₀ 31 nM για την RSK1, 24 nM για την RSK2, 18 nM για την RSK3 και 15 nM για την RSK4. Η πλήρης αναστολή της δραστηριότητας RSK μπορεί να επιτευχθεί σε συγκέντρωση 10 μM. Ο BI-D1870 είναι ένας ισχυρότερος αναστολέας της δραστηριότητας RSK3 και RSK4 και αυτό υποδηλώνει ότι η δομική απόκλιση μεταξύ του αμινοτελικών περιοσών (NTKD) των ισομορφών RSK θα μπορούσε να αξιοποιηθεί για το σχεδιασμό εκλεκτικών στις ισομορφές αναστολέων RSK. Έχει προσδιοριστεί η δραστηριότητα του BI-D1870 έναντι ενός μεγάλου πίνακα κινάσεων. Είναι ενδιαφέρον ότι η δραστηριότητα του BI-D1870 έναντι των RSK ήταν > 500 φορές υψηλότερη από ό, τι για άλλες κινάσεις AGC που εξετάστηκαν στην ομάδα, συμπεριλαμβανομένου του MSK1. Ωστόσο, το BI-D1870 αναστέλλει επίσης τη δραστηριότητα των PLK1, Aurora B, MELK, PIM3, MST2 και GSK3b και πολλά από τα φαινόμενα κυτταρικής σηματοδότησης που παρατηρούνται οφείλονται σε μη ειδικές αλληλεπιδράσεις. Άλλα μειονεκτήματα του BI-D1870 περιλαμβάνουν κακή φαρμακοκινητική (PK) κατατομή λόγω της κακής σταθερότητας του φαρμάκου, της υψηλής κάθαρσης και της βραχείας ημίσειας ζωής στο πλάσμα (32).

1.4.2 Αναστολείς των RSK : GSK2334470

Ο GSK2334470, ένας μικρός αναστολέας του PDK1 που διαπερνά το κύτταρο, δεν αναστέλλει σημαντικά τη δραστηριότητα 93 άλλων πρωτεϊνικών κινασών που εξετάστηκαν, περιλαμβάνοντας 13 AGC κινάσεις που σχετίζονται περισσότερο με την PDK1 κάτι που καταδεικνύει ότι ο GSK2334470 είναι πολύ πιο συγκεκριμένος από άλλους αναφερόμενους αναστολείς PDK1. Ο GSK2334470 κατέστειλε στα βασικά επίπεδα τη φωσφορυλίωση και την ενεργοποίηση των κυτταρολυτικών υποστρωμάτων

TK-βρόγχου SGK και S6K1 που δεν δεσμεύουν PtdIns (3,4,5) P3. Ο GSK2334470 επίσης καταστέλλει αποτελεσματικά τη φωσφορυλίωση και δραστηριότητα του T-βρόγχου του RSK2. Συνολικά, οι μελέτες αποκαλύπτουν ότι τα υποστρώματα PDK1 παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην κινητική της αποφωσφορυλίωσης του T-βρόγχου (35).

1.4.2 Αναστολεas Tac

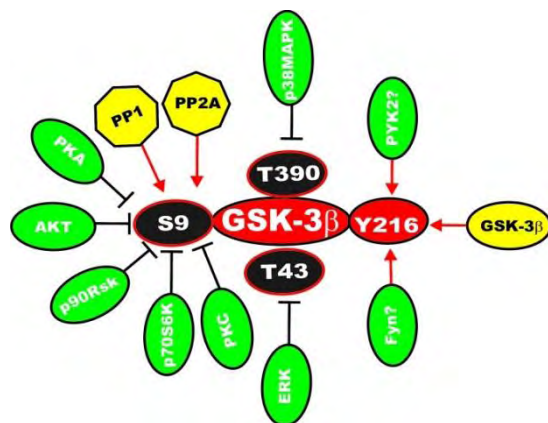
Τα φλαβονοειδή είναι μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες φυσικών προϊόντων, παρουσιάζοντας ένα ευρύ φάσμα φαρμακολογικών δραστηριοτήτων. Κάποιοι μεταβολίτες τους μπορεί να είναι πιο ενεργοί από τις χημικές ενώσεις από τις οποίες προέρχονται. Η ένωση Tac αποτελεί παρακετυλιωμένο παράγωγο του 7-methylether tiliroside, που προέρχεται από την επώαση πλατανοσίδης με τιλιοροσίδης, δύο κουμαρου γλυκοσίδες καμφερόλης που απομονώθηκαν από το μεθανολικό εκχύλισμα των βλαστών του *Platanus orientalis* L (31). Η κυτταροτοξική δράση των αρχικών χημικών ουσιών δεν ήταν ενεργή ενώ ο γλυκοζυλιωμένος τιλιοροσίδης έχει βρεθεί να έχει κυτταροτοξική δράση σε ποικιλία καρκινικών κυτταρικών σειρών. (36)

1.5 Γονίδια στόχοι των S κινασών : GSK-3 α/β

Η δραστικότητα της GSK-3 ελέγχεται με φωσφορυλίωση/αποφωσφορυλίωση.

Η GSK-3α και η GSK-3β εκφράζονται διαρκώς και διατηρούνται σε μεγάλο βαθμό. Οι δραστηριότητές τους ρυθμίζονται από διαφορετικά μονοπάτια διέγερσης και σηματοδότησης. Η δραστικότητα της GSK-3α καταστέλλεται με φωσφορυλίωση στη S21, ενώ η δραστικότητα της GSK-3β αποσιωπείται με φωσφορυλίωση στη S9. Αυτά τα γεγονότα φωσφορυλίωσης στις θέσεις S21 και S9 αναστέλλουν τη δραστικότητα της GSK-3 προκαλώντας μια διαμόρφωση ψευδοϋποστρώματος στα μοτίβα πρόσδεσης υποστρώματος GSK-3α και GSK-3β αντίστοιχα. Η φωσφορυλίωση της GSK-3β στη S9 οδηγεί στην απενεργοποίησή της με πρωτεασωματική αποικοδόμηση και έχει συσχετιστεί με πολλές παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένου του καρκίνου. Διάφορες κινάσες φωσφορυλιώνουν την GSK-3β στο S9 συμπεριλαμβανομένης της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA), της πρωτεϊνικής κινάσης B (PKB α.κ.α. Akt), της ρ90 ριβοσωμικής S6 κινάσης (p90Rsk), της ρ70 ριβοσωμικής S6 κινάσης (p70S6K) (Εικόνα 9).

Ο επιδερμικός αυξητικός παράγοντας (EGF), ο αυξητικός παράγοντας που προέρχεται από αιμοπετάλια (PDGF) και άλλοι αυξητικοί παράγοντες προκαλούν επίσης τη φωσφορυλίωση των GSK-3β (S9) και GSK-3α (S21) μέσω ενεργοποιημένης οδού σηματοδότησης Raf / MEK / ERK / p90Rsk1. Άλλες οδοί σηματοδότησης διεγείρουν τη φωσφορυλίωση και αδρανοποίηση των GSK-3β και GSK-3α με φωσφορυλίωση σε S9 και S21 αντίστοιχα. Έτσι, η δραστικότητα της GSK-3 συχνά διακόπτεται μετά την έκθεση σε μιτογόνους / αναπτυξιακούς παράγοντες. (34).



Εικόνα 9: Θέσεις φωσφορυλίωσης της GSK-3β που ρυθμίζουν την ενεργότητά της.

Πηγή: McCubrey et al.

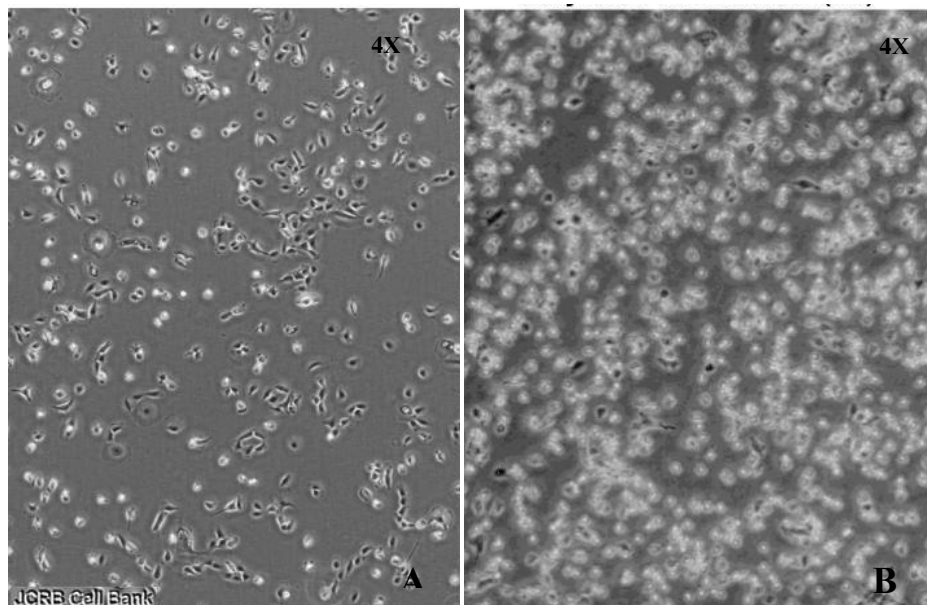
2.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.1 Κυτταροκαλλιέργειες

2.1.1.1 Κυτταρικές σειρές καρκίνου του θυρεοειδούς – PTC και 8505c

Ο καρκινικός κυτταρικός PTC-A αποτελεί μια πρωτογενή καρκινική σειρά η οποία απομονώθηκε από 55χρονη ασθενή από την ερευνητική ομάδα Kounarakis et al. το 2011 για τη μελέτη της ενεργοποίησης του mTOR στο μυελώδες και επιθετικό θηλώδες θυρεοειδικό καρκίνωμα. Η ίδια καρκινική σειρά έχει χρησιμοποιηθεί και από την ερευνητική ομάδα Moraitis et al (2014) για τη μελέτη του συμπλέγματος mTOR-Rictor στον καρκίνο του θυρεοειδούς. Είναι κύτταρα θηλώδους επιθηλίου του θυρεοειδούς επιθετικού τύπου και αναπτύσσονται προσκολλημένα (26,10).

Η καρκινική σειρά 8505c αποτελεί κυτταρική σειρά εγκαθιδρυμένη από μη διαφοροποιημένο θυρεοειδικό καρκίνωμα 78χρονης ασθενούς. Παθολογικά, αυτός ο πρωτογενής ιστός καρκινώματος περιελάμβανε υπολειπόμενα καλά διαφοροποιημένα στοιχεία υποδηλώνοντας καλά διαφοροποιημένη έως μη διαφοροποιημένη εξέλιξη καρκινώματος. Η ανάπτυξή τους επίσης γίνεται όντας προσκολλημένα.



Εικόνα 8: Καρκινικές κυτταρικοί πληθυσμοί του θυρεοειδή 8505C (A) και PTC (B)

2.1.1.2 Καλλιέργεια και ανακαλλιέργεια καρκινικών κυτταρικών σειρών

Αντιδραστήρια καλλιέργειών

Η ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων έγινε σε θρεπτικό μέσο RPMI 1640 (Gibco®) εμπλουτισμένο με εμβρυϊκό βόειο ορό (Fetal Bovine Serum- FBS) (Biosera) 5%, L-γλουταμίνη 1% και πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη 1% (Biochrom).

Τα αντιβιοτικά πενικιλίνη και στρεπτομυκίνη χρησιμοποιούνται για την πρόληψη της βακτηριακής μόλυνσης των κυτταρικών καλλιιεργειών λόγω της αποτελεσματικής συνδυασμένης δράσης τους κατά gram-θετικών και gram-αρνητικών βακτηριδίων. Η πενικιλίνη απομονώθηκε αρχικά από τον μύκητα *Penicillium* και δρα παρεμβαίνοντας άμεσα στον κύκλο εργασιών του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος και έμμεσα ενεργοποιώντας την απελευθέρωση των ενζύμων που μεταβάλλουν περαιτέρω το κυτταρικό τοίχωμα. Η στρεπτομυκίνη απομονώθηκε αρχικά από τον *Streptomyces griseus*. Λειτουργεί δεσμεύοντας την υπομονάδα 30S του βακτηριακού ριβοσώματος, που οδηγεί στην αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης και του θανάτου σε ευαίσθητα βακτήρια.

Η L-γλουταμίνη είναι ένα ασταθές βασικό αμινοξύ που απαιτείται σε σκευάσματα μέσων κυτταροκαλλιέργειας. Τα περισσότερα εμπορικά διαθέσιμα μέσα σχηματίζονται με ελεύθερη L-γλουταμίνη η οποία είτε περιλαμβάνεται στον βασικό τύπο είτε προστίθεται σε υγρές συνθέσεις κατά τον χρόνο χρήσης. Η L-γλουταμίνη είναι ασταθής σε φυσιολογικό pH σε υγρά μέσα. Διασπάται σε αμμώνιο και πυρογλουταμικό με ρυθμούς που το καθιστούν πρόβλημα σε πολλές εφαρμογές βιομηχανίας. Σήμερα, πολλά ιδιόκτητα μέσα που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία συμπληρώνονται με L-γλουταμίνη σε μορφές διπεπτιδίων, όπως η αλανυλ-1-γλουταμίνη και η γλυκυλ-1-γλουταμίνη. Μία λιγότερο καθορισμένη πηγή L-γλουταμίνης προέρχεται από τη χρήση υδρολυμάτων πρωτεϊνών, ιδιαίτερα υδρολυμάτων γλουτένης.

Οι κύριες λειτουργίες της γλουταμίνης σε συστήματα κυτταροκαλλιέργειας:

Η γλουταμίνη υποστηρίζει την ανάπτυξη κυττάρων που έχουν υψηλές απαιτήσεις ενέργειας και συνθέτουν μεγάλες ποσότητες πρωτεϊνών και νουκλεϊνικών οξέων. Είναι μια εναλλακτική πηγή ενέργειας για ταχέως διαιρούμενα κύτταρα και κύτταρα που

χρησιμοποιούν γλυκόζη αναποτελεσματικά. Τα κύτταρα απαιτούν άτομα αζώτου για την κατασκευή μορίων όπως τα νουκλεοτίδια, τα αμινοξέα, τα αμινο-σάκχαρα και οι βιταμίνες. Το αμμώνιο είναι μια ανόργανη πηγή αζώτου που υπάρχει κυρίως ως θετικά φορτισμένο κατιόν, NH_4^+ , σε φυσιολογικό pH. Το άζωτο αμμωνίου που χρησιμοποιείται από τα κύτταρα αρχικά ενσωματώνεται στο οργανικό άζωτο ως αμίνη γλουταμικού ή αμίδιο γλουταμίνης. Αυτά τα δύο αμινοξέα παρέχουν τις πρωταρχικές δεξαμενές αζώτου για τη σύνθεση πρωτεϊνών, νουκλεϊνικών οξέων και άλλων αζωτούχων ενώσεων.

Το ρυθμιστικό διάλυμα με φωσφορικό άλας (Phosphate-buffered saline – PBS) (Gibco®) είναι ένα ισορροπημένο διάλυμα άλατος που χρησιμοποιείται για μια ποικιλία εφαρμογών κυτταρικής καλλιέργειας, όπως πλύση κυττάρων πριν από τη διάσπαση, μεταφορά κυττάρων ή δειγμάτων ιστών, αραίωση των κυττάρων για μέτρηση και παρασκευή αντιδραστηρίων. Το PBS τυποποιείται χωρίς ασβέστιο (Ca^{2+}) και μαγνήσιο (Mg^{2+}) για ξέπλυμα χηλικών ενώσεων από την καλλιέργεια πριν από τον κυτταρικό διαχωρισμό καθώς αυτά μπορεί να προκαλέσουν τα κύτταρα να είναι προσκολλημένα μεταξύ τους.

Η θρυψίνη είναι μια πρωτεάση σερίνης που προέρχεται από το πάγκρεας χοίρου. Πρόκειται για ένα πολυπεπίδιο απλής αλυσίδας με κατάλοιπα 223 αμινοξέων με ειδικότητα υποστρώματος που βασίζεται σε θετικά φορτισμένες πλευρικές αλυσίδες λυσίνης και αργινίνης. Η θρυψίνη διασπά κατά κύριο λόγο τις πεπτιδικές αλυσίδες στις καρβοξυλικές πλευρές της λυσίνης και της αργινίνης, εκτός και αν αυτές ακολουθούνται από προλίνη. Κυρίως χρησιμοποιείται για τη διάσπαση και διαχωρισμό προσκολλημένων κυττάρων. Το αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) είναι ένας χηλικός παράγοντας που προστίθεται συχνά για την ενίσχυση της ενζυματικής δράσης του διαλύματος θρυψίνης. Το EDTA δρα εξουδετερώνοντας τα ιόντα ασβεστίου (Ca^{2+}) και μαγνησίου (Mg^{2+}) που ενισχύουν την προσκόλληση ανάμεσα στα κύτταρα, όπως αναφέρεται και παραπάνω. Η θρυψίνη βρίσκεται αποθηκευμένη στους -20°C σε συγκέντρωση 10X αλλά χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 1X η οποία μετά την παρασκευή της αποθηκεύεται στους 4°C . Η αραίωση από 10X σε 1X γίνεται με PBS 1X.

2.1.1.3 Θρυψινοποίηση κυττάρων

Οι καλλιέργειες καρκινικών κυττάρων αναπτύχθηκαν μέχρι την επιθυμητή συγκέντρωση (confluency) σε 25-cm² φλάσκα ιστοκαλλιέργειας είτε σε δίσκο Petri των 60-mm με 5 ml θρεπτικού μέσου ιστοκαλλιέργειας. Τα κύτταρα υπόκεινται σε κατεργασία με τρυψίνη και στη συνέχεια επανατοποθετούνται σε δευτερογενείς καλλιέργειες. Η διαδικασία απομάκρυνσης των κυττάρων από την πρωτογενή καλλιέργεια και η μεταφορά τους σε δευτερογενείς καλλιέργειες αποτελεί ένα πέρασμα ή υποκαλλιέργεια. Όλες οι επώσεις καλλιιεργειών πραγματοποιήθηκαν σε υγροποιημένο επωαστήρα με 37°C και 5% CO² προκειμένου το pH να παραμένει σταθερό στο 7.4. Όλοι οι χειρισμοί των καλλιιεργειών των καρκινικών κυττάρων πραγματοποιούνται σε στείρες συνθήκες, σε θάλαμο νηματικής ροής.

- Αφαίρεση του θρεπτικού υλικού με πιπέτα ή απευθείας απομάκρυνση του στη φιάλη αποβλήτων.
- Πλύση με 3ml 1X PBS για την απομάκρυνση υπολείμματος ορού FBS που μπορεί να αναστείλει τη δράση της τρυψίνης.
- Προσθήκη στη φλάσκα/τρυβλίο 1ml τρυψίνης (θερμοκρασία δωματίου) έτσι ώστε να καλύψει το προσκολλημένο στρώμα κυττάρων.
- Τοποθέτηση της φλάσκας στον κλίβανο (37°C) για 1-2 λεπτά. Ελαφρύ χτύπημα του πάτου της φλάσκας/τρυβλίου έτσι ώστε να απομακρυνθούν τα κύτταρα. Έλεγχος σε ανεστραμμένο μικροσκόπιο για επιβεβαίωση ότι τα κύτταρα έχουν στρογγυλοποιηθεί και αποκολληθεί από την επιφάνεια.. Σε περίπτωση που τα κύτταρα δεν έχουν αποκολληθεί σε ικανοποιητικό βαθμό, η φλάσκα/τρυβλίο επιστρέφεται για 1-2 επιπλέον λεπτά στον κλίβανο.
- Στη συνέχεια, στο θάλαμο νηματικής ροής, γίνεται προσθήκη 4ml θρεπτικού μέσου με ορό (RPMI). Το εναιώρημα των κυττάρων συλλέγεται σε μια πιπέτα και ξεπλένεται το στρώμα των κυττάρων δύο ή τρεις φορές για να διαχωριστούν τα κύτταρα και να απομακρυνθούν τυχόν υπόλοιπα προσκολλημένα κύτταρα. Μόλις απομακρυνθούν τα κύτταρα, προστίθεται μέσο που περιέχει ορό (RPMI) για να αναστείλει περαιτέρω δραστικότητα θρυψίνης που μπορεί να βλάψει κύτταρα.

- Προσθήκη στη φλάσκα της επιθυμητής ποσότητας κυττάρων από την καλλιέργεια στην οποία έγινε θρυψινοποίηση, ανάλογα με τον ρυθμό ανάπτυξης της κάθε σειράς. Συμπλήρωση με θρεπτικό μέσο με ορό. Στις φλάσκες μέχρι τα 5ml και στα τρυβλία μέχρι τα 9ml.
- Παρατήρηση των κυττάρων στο μικροσκόπιο. Επανατοποθέτηση της καλλιέργειας στον κλίβανο (37°C, 5% CO₂).
- Ανανέωση θρεπτικού υλικού, με απομάκρυνση του παλιού και προσθήκη νέου, γινόταν ανάλογα με τις ανάγκες της κάθε κυτταρικής σειράς. Αυτό συνέβαινε συνήθως στις 3-4 μέρες.
- Πέρασμα (passage) με θρυψίνη γινόταν ανάλογα με τη συγκέντρωση (confluency) των κυττάρων (Βήματα 1-7).

2.1.1.4 Απόψυξη και ψύξη κυττάρων

1) Απόψυξη

Η διαδικασία αφορά ξεπάργωμα κυττάρων που έχουν αποθηκευτεί τους -80°C ή σε υγρό άζωτο, σε φιαλίδια (cryovials) σε ειδικό μέσο για πάγωμα (freezing medium).

Η διαδικασία πραγματοποιείται με γρήγορες κινήσεις προκειμένου να διατηρηθεί η ακεραιότητα των κυττάρων όσο το δυνατό καλύτερα.

- Αφαίρεση του επιθυτού cryovial από την κατάψυξη των -80°C ή υγρό άζωτο και τοποθέτηση στο υδατόλουτρο, που έχει ρυθμιστεί στους 37°C . Ανακίνηση του cryovial περίπου 1min στο υδατόλουτρο. Το cryovial πιάνεται με προσοχή από το καπάκι έτσι ώστε να μην ακουμπήσει στο νερό του υδατόλουτρου.
- Αφού φανεί πως τα κύτταρα έχουν ξεπαγώσει, γίνεται καθαρισμός του cryovial με αιθανόλη πριν το μεταφέρουμε στο θάλαμο νηματικής ροής όπου θα ανοιχτεί.
- Αφαίρεση του περιεχομένου σε falcon φυγοκέντρησης με μια κίνηση.
- Προσθήκη 5ml εμπλουτισμένου θρεπτικού μέσου.
- Φυγοκέντρωση στις 900rpm για 5min.
- Αφαίρεση υπερκειμένου, επαναιώρηση ιζήματος.
- Προσθήκη 5ml στο falcon και στη συνέχεια μεταφορά με πιπέτα σε μια φλάσκα (25-cm^2).
- Τοποθέτηση στον κλίβανο επώασης

2) Ψύξη

Για τη διατήρηση κυττάρων, αποφυγή της γήρανσης, μείωση του κινδύνου επιμόλυνσης και ελαχιστοποίηση γενετικής παρέκκλισης, οι κυτταρικές σειρές θα πρέπει να είναι παγωμένες για μακροχρόνια αποθήκευση. Χωρίς τη χρήση κρυοπροστατευτικού

παράγοντα το πάγωμα θα ήταν θανατηφόρο για τα κύτταρα σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις. Γενικά, μια κρυοπροστατευτική ουσία όπως το διμεθυλοσουλφοξείδιο (dimethylsulfoxide- DMSO) χρησιμοποιείται μαζί με πλήρες θρεπτικό μέσο για διατήρηση κυττάρων στους -70°C ή χαμηλότερα. Το DMSO επίσης δρά για να μειώσει το σημείο παγώματος και επιτρέπει ενά βραδύτερο ρυθμό παγώματος. Το σταδιακό πάγωμα μειώνει τον κίνδυνο του σχηματισμού κρυστάλλων και τον τραυματισμό κυττάρων.

Το μέσο για πάγωμα (freezing medium) αποτελείται από 90% FBS και 10% DMSO. Για κάθε διαδικασία παρασκευάζεται φρέσκο μέσο και φυλάσσεται συνεχώς στον πάγο (το DMSO είναι τοξικό για τα κύτταρα σε θερμοκρασία δωματίου).

- Θρυψινοποίηση των κυττάρων από το plate καλλιέργειάς τους (βήματα 1-4 από το την Καλλιέργεια/Ανακαλλιέργεια). Καλό είναι να χρησιμοποιούνται κύτταρα που βρίσκονται στη λογαριθμική φάση της ανάπτυξης τους για κρυοσυντήρηση.
- Στη συνέχεια μετρώνται τα κύτταρα στην Neubauer πλάκα. Για αποθήκευση χρειάζονται τουλάχιστον 3×10^6 κύτταρα για κάθε cryovial, στο οποίο αντιστοιχεί 1ml freezing medium.\
- Αναρρόφηση υπερκειμένου της φλάσκας με πιπέτα και τοποθέτηση σε falcon το οποίο στη συνέχεια θα φυγοκεντρηθεί στις 1200rpm για 10min.
- Αφαίρεση υπερκειμένου από το falcon και επαναιώρηση του ιζήματος.
- Προσθήκη 1ml freezing medium σταγόνα-σταγόνα στο falcon με μεγάλη προσοχή έτσι ώστε να μην προκληθεί βλάβη στα κύτταρα.
- Τοποθέτηση του 1ml freezing medium μαζί με τα κύτταρα στο cryovial
- Μεταφορά και αποθήκευση cryovial στον καταψύκτη των -80°C .

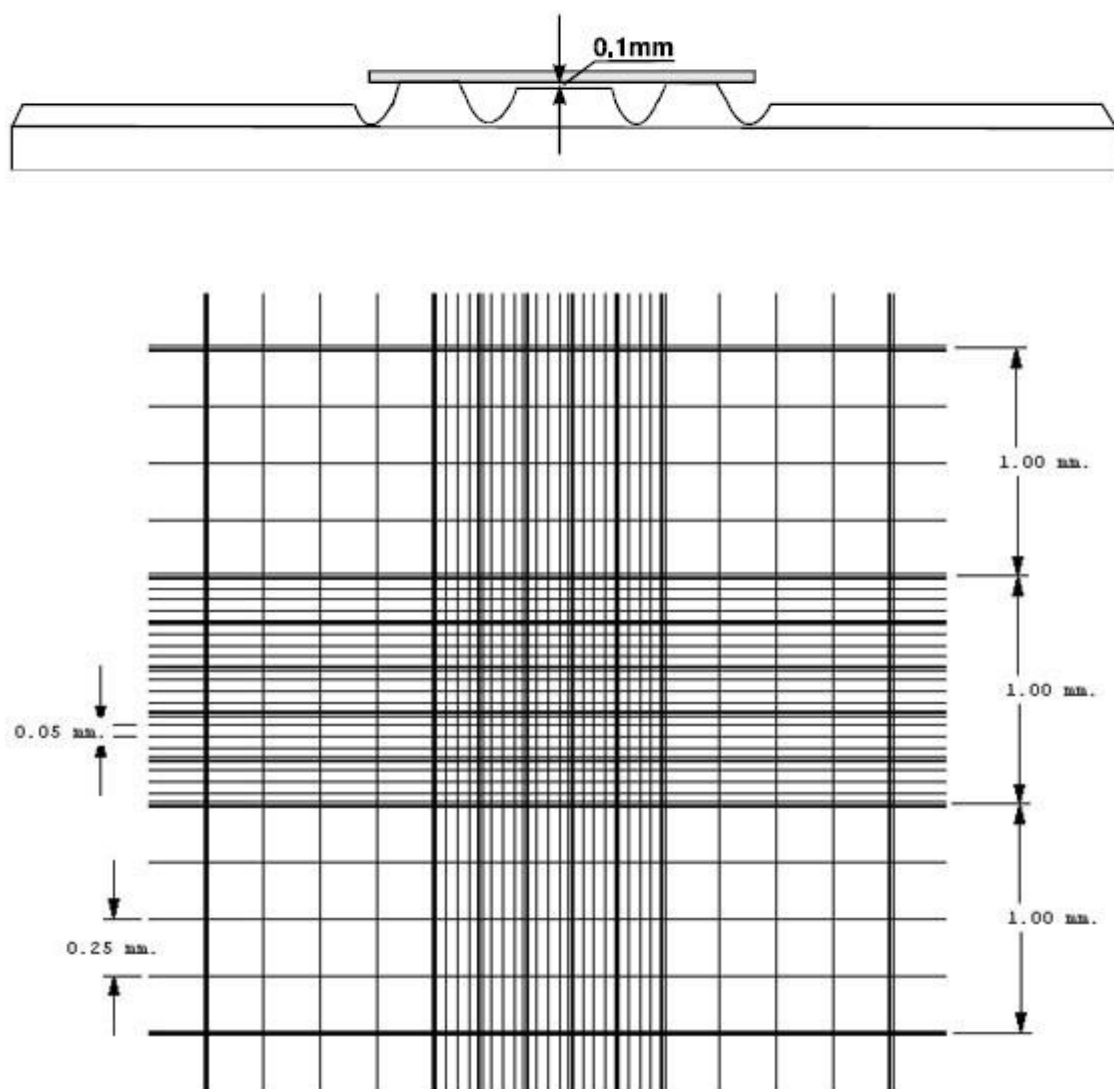
Το cryovial σημειώνεται στο εξωτερικό του το όνομα της κυτταρικής σειράς, την ημερομηνία αποθήκευσης και τον αριθμό των κυττάρων που αποθηκεύτηκαν.

2.1.1.5 Προσδιορισμός του αριθμού και της βιωσιμότητας των κυττάρων με αιματοκυτταρόμετρο και χρώση με Trypan Blue

Ο προσδιορισμός του αριθμού των κυττάρων στην καλλιέργεια είναι σημαντικός για την τυποποίηση των συνθηκών της καλλιέργειας και την πραγματοποίηση πειραμάτων ποσοτικοποίησης με ακρίβεια.

Ένα αιματοκυτταρόμετρο είναι ένα χοντρό γυαλί με μία κεντρική περιοχή σχεδιασμένη ως ένας θάλαμος μέτρησης. Το κεντρικό τμήμα χωρίζεται σε δύο θαλάμους μέτρησης από ένα εγκάρσιο αυλάκι. Κάθε θάλαμος μέτρησης αποτελείται από ένα πλέγμα επί του οποίου χαρά ένα πλέγμα 3×3 mm. Αυτό το πλέγμα διαιρείται σε εννέα δευτερεύοντα τετράγωνα, κάθε 1×1 mm. Τα τέσσερα τετράγωνα γωνιών και το κεντρικό τετράγωνο χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό του αριθμού των κυψελών. Τα τετράγωνα γωνιών διαιρούνται περαιτέρω σε 16 τετράγωνα τετράγωνα και το κεντρικό τετράγωνο σε 25 τριτογενή τετράγωνα για να βοηθήσει στην καταμέτρηση των κυττάρων. Η πλάκα του αιματοκυτταρόμετρου συνοδεύεται από μια παχειά καλυπτρίδα.

Το κυτταρικό εναιώρημα τοποθετείται πάνω στην πλάκα αιματοκυτταρόμετρου στην καθορισμένη περιοχή, καλύπτεται με την καλυπτρίδα ώστε να είναι δυνατή η μέτρηση της κυτταρικής πυκνότητας.



Εικόνα 9 : Διαφάνεια και κάλυμμα αιμακυτόμετρου. Το κάλυμμα εφαρμόζεται στην κεντρική περιοχή της πλάκας και το κυτταρικό εναιώρημα προστίθεται στο θάλαμο μέτρησης χρησιμοποιώντας μια πιπέτα. Κάθε θάλαμος μετρήσεως έχει ένα πλέγμα 3 χ 3 mm. Τα τέσσερα τετράγωνα γωνιών και η κεντρική πλατεία υπολογίζονται σε κάθε πλευρά του αιματοκυτομέτρου.

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Μετά από επεξεργασία της καλλιέργειας των κυττάρων με θρυψίνη, σε eppendorf προστίθενται 90μl εναιωρήματος κυττάρων και 10μl χρωστικής Trypan Blue 0.4% (w/v) (Biochrom). Προσθήκη του μείγματος αυτού στην πλάκα του αιματοκυτταρόμετρου. Μεταφορά της πλάκας στο μικροσκόπιο για παρατήρηση και μέτρηση.

Υπολογισμός αριθμού κυττάρων

Προσδιορισμός κυττάρων ανά ml σύμφωνα με τους παρακάτω υπολογισμούς:

Κύτταρα / ml = μέσος όρος μετρήσεων ανά τετραγωνικό \times συντελεστής αραίωσης $\times 10^4$.

Ολικά κύτταρα = κύτταρα / ml \times ολικό αρχικό όγκο κυτταρικού εναιωρήματος από την οποία ελήφθη το δείγμα.

Ο αριθμός 10^4 είναι ο συντελεστής διόρθωσης όγκου για το αιμοκυτταρόμετρο: κάθε τετράγωνο είναι $1 \times 1 \text{ mm}$ και το βάθος είναι $0,1 \text{ mm}$.

2.1.1.6 Συλλογή και αποθήκευση κυττάρων για λύση

- Αφαίρεση υπερκείμενου φλάσκας
- Προσθήκη $\sim 3\text{ml}$ PBS 1X και έκπλυση φλάσκας
- Αφαίρεση PBS 1X και προσθήκη θρυψίνης 1X
- Τοποθέτηση της φλάσκας στον κλίβανο για $\sim 3\text{min}$
- Έλεγχος των κυττάρων στο μικροσκόπιο για την αποκόλληση τους από την επιφάνεια της φλάσκας
- Σε στείρες συνθήκες, προσθήκη 4ml RPMI 5% (5% FBS) για την απενεργοποίηση της θρυψίνης. Καλή ανάδευση προς όλα τα άκρα της φλάσκας.
- Μεταφορά 90μl εναιωρήματος κυττάρων και 10μl χρωστικής Trypan Blue σε eppendorf ώστε να μετρηθούν σε πλάκα Neubauer στο μικροσκόπιο.

- Μέτρηση κυττάρων με τον τρόπο που αναφέρεται στο αντίστοιχο τμήμα παραπάνω. Επιθυμητός αριθμός κυττάρων ώστε να γίνει συλλογή : 3×10^6 κύτταρα.
- Μεταφορά κατάλληλης ποσότητας από το περιεχόμενο της καλλιέργειας μέσα σε μικρό falcon (15ml). Προσθήκη 10ml RPMI 5%.
- Φυγοκέντρηση στις 1200rpm για 10min.
- Αφαίρεση υπερκειμένου, διάλυση ιζήματος, προσθήκη PBS 1X για πλύση μέχρι τα 10ml.
- Φυγοκέντρηση στις 900rpm για 5min
- Αφαίρεση υπερκειμένου, επαναιώρηση ιζήματος και φυγοκέντρηση στις 900rpm για 5min
- Αφαίρεση υπερκειμένου, επαναιώρηση ιζήματος και φυγοκέντρηση στις 900rpm για 5min
- Μετά το τέλος της τελευταίας φυγοκέντρησης, αφαιρείται το υπερκείμενο και το falcon αφήνεται αναποδογυρισμένο να στεγνώσει σε χαρτί εντελώς.
- Όταν στεγνώσει μεταφέρεται στους -80°C για αποθήκευση

2.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Μέθοδος ελέγχου in vitro κυτταροτοξικότητας με χρώση SRB

Η δοκιμασία σουλφοροδαμίνης Β (SRB) όπως περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους Skehan και τους συνεργάτες του, αναπτύχθηκε για χρήση στο πρόγραμμα διάγνωσης αντικαρκινικών φαρμάκων μεγάλης κλίμακας του Εθνικού Ινστιτούτου Καρκίνου της Αμερικής (National Cancer Institute - NCI) που ξεκίνησε το 1985. Ο προσδιορισμός SRB βασίζεται στην ικανότητα της βαφής SRB να συνδέεται ηλεκτροστατικά και pH να εξαρτάται από πρωτεϊνικές βασικές περιοχές αμινοξέων. Υπό ήπιες όξινες συνθήκες, το SRB δεσμεύεται με πρωτεϊνικές βασικές αμινοξικές περιοχές των σταθεροποιημένων με τριχλωροοξικό οξύ (TCA) κυττάρων. Μπορεί να εκχυλισθεί ποσοτικά από τα κύτταρα και να διαλυτοποιηθεί για μέτρηση οπτικής πυκνότητας (OD) από ασθενείς βάσεις όπως η βάση Tris. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης SRB είναι γραμμικά με τον αριθμό των κυττάρων. Το τελικό σημείο της ανάλυσης SRB είναι χρωματομετρική, μη καταστρεπτική και σταθερή. Η δοκιμασία SRB αντιπροσωπεύει μια κατάλληλη και ευαίσθητη δοκιμασία για τη μέτρηση της επαγόμενης από φάρμακο κυτταροτοξικότητας και είναι χρήσιμη για την ποσοτικοποίηση της κλωνογονικότητας.

Το SRB είναι μια ανιονική λαμπερή ροζ χρωστική αμινοξανθίνης με δύο σουλφονικές ομάδες. Ο μοριακός του τύπος και το μοριακό βάρος είναι $C_{27}H_{30}N_2O_7S_2$ και 558,66, αντίστοιχα. Το βέλτιστο μήκος κύματος για τη μέτρηση της OD του SRB είναι 564 nm. Οι καμπύλες συγκέντρωσης OD έναντι βαφής είναι γραμμικές μέχρι 1.5-2 μονάδες OD.

Χρησιμοποιώντας τις μετρήσεις οπτικής απορρόφησης από τις οπές που αντικατοπτρίζουν τα κύτταρα την ώρα της προσθήκης των ουσιών (Tz), τα κύτταρα μάρτυρες (C) καθώς και τα κύτταρα

στα οποία έχει προστεθεί αντίστοιχη ποσότητα εξεταζόμενης ουσίας σε κάθε επιθυμητή συγκέντρωση (Ti), δύναται ο υπολογισμός της ποσοστιαίας ανάπτυξης των κυττάρων (Growth Rate

%,) για κάθε συγκέντρωση που έχει χρησιμοποιηθεί με την χρήση του παρακάτω τύπου :

$$[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 \text{ για συγκεντρώσεις όπου } Ti \geq Tz$$

$$[(Ti-Tz)/Tz] \times 100 \text{ για συγκεντρώσεις όπου } Ti < Tz$$

Εκτός της ποσοστιαίας ανάπτυξης, για κάθε εξεταζόμενη ουσία, υπολογίζονται και τρεις διαφορετικοί παράμετροι;

·Growth inhibition 50% (GI50): υπολογίζεται από τον τύπο $[(Ti-Tz)/(C-Tz)] \times 100 = 50$ και είναι η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιτυγχάνεται αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων στο 50%

·Total growth inhibition (TGI): υπολογίζεται από τον τύπο $Ti = Tz$ και είναι η συγκέντρωση του

φαρμάκου μέσω της οποίας επιτυγχάνεται ολική αναστολή της ανάπτυξης των κυττάρων

·Lethal concentration 50% (LC50): η συγκέντρωση του φαρμάκου μέσω της οποίας επιφέρεται

θάνατος στο 50% του αρχικού πληθυσμού των κυττάρων

Η κλινική σημασία των in vitro δεδομένων κυτταροτοξικότητας είναι ένα σημαντικό ζήτημα. Για να εκτιμηθεί η πιθανή κλινική δραστηριότητα ενός φαρμάκου με βάση in vitro δεδομένα, ορίστηκε η ως σχετική αντικαρκινική δραστηριότητα (RAA) ημέγιστη συγκέντρωση ενός φαρμάκου στο πλάσμα / IC_{50} . Γενικά, υποτίθεται ότι η διαλογή φαρμάκου in vitro ήταν περίπου 60% αξιόπιστη για την πρόβλεψη ευαισθησίας in vivo και 90% αξιόπιστη για in vivo αντίσταση.

ΥΛΙΚΑ

Μικροπλακίδια κυτταροκαλλιέργειας 96 θέσεων με επίπεδο πυθμένα

Αντιδραστήρια κλασσικής καλλιέργειας κυττάρων (θρεπτικό υλικό, ορός, θρυψίνη, PBS 1X, κλίβανος επώασης, falcons, φλάσκες, πιπέττες, finntips)

50% (w/v) TCA

1% Acetic acid

0.4% (w/v) SRB διαλυμένη σε 1% acetic acid

10mM Tris base (pH 10.0)

Φωτόμετρο (EL-311 BIOTEK)

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Καθόλη τη διάρκεια της διαδικασίας ο χειρισμός των κυττάρων πραγματοποιείται σε στείρες συνθήκες σε θάλαμο νηματικής ροής.

Ημέρα 1η:

Έλεγχος κυττάρων για το στάδιο της ανάπτυξής τους και ανανέωση του θρεπτικού υλικού

- Αφαίρεση υπερκειμένου φλάσκας
- Προσθήκη 3ml PBS 1X (για 25mm² φλάσκα) και πλύση
- Προσθήκη νέου θρεπτικού υλικού (RPMI με FBS, pen/strep, L- Glu)

Ημέρα 2η:

Συλλογή κυττάρων με θρυψινισμό και στρώσιμο σε μικροπλακίδιο 96 θέσεων.

- Αφαίρεση υπερκειμένου φλάσκας
- Προσθήκη 3ml PBS 1X (για 25mm² φλάσκα) και πλύση
- Προσθήκη 1ml θρυψίνης (για 25mm² φλάσκα) και τοποθέτηση στον κλίβανο (37°C) για 2-3min
- Αφαίρεση από τον κλίβανο και έλεγχος στο μικροσκόπιο
- Στη συνέχεια, αφού ελεγχεί ότι τα κύτταρα έχουν αποκολληθεί πλήρως από την επιφάνεια της φλάσκας, προστίθονται 4ml RPMI (5%) προκειμένου να γίνει η απενεργοποίηση της θρυψίνης. Γίνεται καλή ανάδευση με την πιπέτα προς όλα τα σημεία της φλάσκας
- Το υπερκείμενο που περιέχει θρυψίνη και RPMI μεταφέρεται σε falcon φυγοκέντρωσης
- Επιστρέφεται στη φλάσκα το μέρος των κυττάρων το οποίο έχει υπολογιστεί ως κατάλληλο να φτάσει την επιθυμητή συγκέντρωση (confluency) μέχρι το επόμενο πέρασμα (passage).

- Από το υπόλοιπο που βρίσκεται στο falcon, μετά από καλή ανάδευση προκειμένου να ληφθεί αντιπροσωπευτικός αριθμός κυττάρων, μεταφέρονται 90μl κυττάρων σε ένα erpendorf και εκεί προσθέτονται 10μl χρωστικής Trypan Blue.
- Στη συνέχεια, το μείγμα του εναιωρήματος των κυττάρων και της χρωστικής μεταφέρονται με πιπέτα σε πλάκα Neubauer για να γίνει η μέτρηση των κυττάρων.
- Μετά τη μέτρηση των κυττάρων/ml, γίνονται οι κατάλληλοι υπολογισμοί με σκοπό να τοποθετηθούν σε κάθε πηγαδάκι 5000cells. Τα πηγαδάκια που υπολογίζονται για να τοποθετηθούν κύτταρα είναι: 1) αυτά που εκτίθενται στα φάρμακα που μελετώνται, 2) τα controls τα οποία αναπτύσσονται χωρίς κάποια προσθήκη μέχρι τη λήξη της επίδρασης των φαρμάκων προκειμένου να συγκρίνεται ο φυσιολογικός ρυθμός ανάπτυξης των καρκινικών σειρών και 3) τα T₀ στα οποία προστίθεται 50% TCA την ημέρα προσθήκης των φαρμάκων. Έτσι υπολογίζεται η επίδραση στην ανάπτυξη των κυττάρων από την στιγμή της έκθεσης στο φάρμακο.
- Από το falcon όπου ήδη υπάρχει το εναιώρημα των κυττάρων, μεταφέρεται η κατάλληλη ποσότητα με πιπέτα σε νέο falcon και εκεί προστίθεται PBS 1X.
- Φυγοκέντρωση για 10min στις 1200 rpm.
- Αφαίρεση υπερκειμένου, επαναδιάλυση ιζήματος. Προσθήκη ποσότητας RPMI σύμφωνα με τον αριθμό των wells που θα στρωθούν με κύτταρα.
- Με την πιπέτα finntips, προστίθενται σε κάθε πηγαδάκι 100μl.

Ημέρα 3η:

Προσθήκη φαρμάκων

- Μετά από 24 ώρες ανάπτυξης των κυττάρων που έχουν προστεθεί στα πηγαδάκια, γίνεται προσθήκη των φαρμάκων που τα οποία μελετώνται για την επίδρασή τους στις θυροειδικές καρκινικές σειρές PTC και 8505c.

-Οι αναστολείς BI-1870 (AdooQ Bioscience, Catalog No. A12452) και GSK2334470 (AdooQ Bioscience, Catalog No. A12767) προστέθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις το καθένα: 100, 10, 1, 0.1.

-Πριν την προσθήκη στα πηγαδάκια, προετοιμάζονται οι παραπάνω αραιώσεις. Τα διαθέσιμα stock είχαν συγκέντρωση 20mM. Μετά τους κατάλληλους υπολογισμούς, τα φάρμακα αραιώνονται σε RPMI 5%. Ο όγκος του κάθε φαρμάκου που προστίθεται σε κάθε πηγαδάκι είναι 100μl. Πριν την προσθήκη σε κάθε πηγαδάκι γίνεται καλή ανάδευση έτσι ώστε η συγκέντρωση των φαρμάκων να είναι ίδια.

- Στα control πηγαδάκια προστίθενται 100μl RPMI 5%.

- Τέλος, στα T₀ πηγαδάκια, σε μη στείρες συνθήκες προστίθενται 100μl RPMI 5% και στη συνέχεια 50μl 50% TCA και αφήνεται για επώαση στους 4°C για 1hr. Μετά τη 1hr το TCA αφαιρείται από τα T₀ και ξεπλένεται καλά με απεσταγμένο νερό.

Ημέρα 4η:

Ημέρα παρακολούθησης ανάπτυξης των κυττάρων με προσθήκη φαρμάκων και των controls

Ημέρα 5η:

Μονιμοποίηση κυττάρων και χρώση – Μέτρηση απορρόφησης

- Τελευταίο στάδιο της διαδικασίας αποτελεί η μονιμοποίηση των κυττάρων. Σε μη στείρες συνθήκες, γίνεται προσθήκη 50μl κρύου TCA σε όλα τα πηγαδάκια και στη συνέχεια γίνεται επώαση στους 4°C για 1hr. Σημαντικό είναι η προσθήκη του TCA να γίνεται ήπια και ακουμπώντας τα τοιχώματα του well ώστε να μην γίνει αποκόλληση των κυττάρων.
- Αφού τελειώσει ο χρόνος της επώασης με TCA γίνονται καλές πλύσεις με απεσταγμένο νερό.
- Τα plate αφήνονται να στεγνώσουν εντελώς πριν το επόμενο βήμα για περίπου 15min.
- Στη συνέχεια, προστίθεται η χρωστική SRB. Προστίθενται 50μl αυτής σε κάθε πηγαδάκι και αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 10min.
- Μόλις η επώαση με την SRB ολοκληρωθεί, γίνονται πλύσεις με 1% οξικό οξύ (CH_3COOH) για την απομάκρυνσή της.
- Διαλυτοποίηση τη συνδεδεμένης με πρωτεΐνη χρωστικής με προσθήκη 100 μL 10 mM Tris βάσης ανά πηγαδάκι. Επώαση για 10min σε κλίβανο στους 37°C. Ανακίνηση των plate για τουλάχιστον 10 λεπτά σε αναδευτήρα για να ομογενοποίηση του διαλύματος χρωστικής.
- Μέτρηση της οπτικής πυκνότητας με τη χρήση ημι-αυτόματης συσκευής ανάλυσης μικροπλακιδίων 96 θέσεων (EL-311 BIOTEK) σε μήκος κύματος 530 nm.

Επώαση με T-ac καλλιιεργειών καρκινικών κυττάρων

Η συγκέντρωση **T-ac** που προστέθηκε σε κάθε φλάσκα των 25-mm², που περιείχε 10⁶ κύτταρα η κάθεμια, είναι 20μM. Η προσθήκη της ποσότητας γίνεται απευθείας στο υπερκείμενο της φλάσκας.

Μετά την ολοκλήρωση της επώασης στις δύο χρονικές στιγμές (timepoints) που μελετήθηκε η επίδραση του T-ac, στις 4 και 6 ώρες, προστέθηκε θρυψίνη και ακολούθησε η διαδικασία θρυψινοποίησης που αναφέρεται στο υποκεφάλαιο “Θρυψινοποίηση και ανακαλλιέργεια κυττάρων”. Η δράση της θρυψίνης δεν έγινε σε κλίβανο στους 37°C, αλλά στον πάγο μέχρι να αποκολληθούν όλα τα κύτταρα από τον επιφάνεια της φλάσκας. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η “Διαδικασία συλλογής και αποθήκευσης κυττάρων για λύση”.

Λύση κυττάρων

Η διαδικασία πραγματοποιείται σε πάγο καθ’ όλη τη διάρκεια της. Αφαιρώ τα falcons με το pellet που συλλέχθηκε και αποθηκεύτηκε από τους -80°C. Η λύση των πρωτεϊνών που υπάρχουν στο pellet γίνεται με προσθήκη RIPA Buffer 1X.

Το ρυθμιστικό διάλυμα RIPA λύνει αποτελεσματικά και εκχυλίζει πρωτεΐνη από καλλιιεργημένα κύτταρα θηλαστικών, συμπεριλαμβανομένων επιμεταλλωμένων κυττάρων και κυττάρων εναιωρήματος με σφαιρίδια. Το αντιδραστήριο αυτό επιτρέπει την εξαγωγή μεμβρανών, πυρηνικών και κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών. Το RIPA έχει αποκτήσει το όνομά του από την αρχική εφαρμογή για την οποία αναπτύχθηκε, τη δοκιμασία ραδιοανοσοκατακρήμνισης (radio-immunoprecipitation assay). Το αντιδραστήριο λύσης κυττάρων RIPA είναι αποτελεσματικό για την εκχύλιση πρωτεϊνών από μια ποικιλία κυτταρικών τύπων, επειδή περιέχει τρία μη ιοντικά και ιοντικά απορρυπαντικά.

Το RIPA 1X βρίσκεται αποθηκευμένο στους -20°C.

Για κάθε 10^6 κύτταρα χρησιμοποιούνται 60μl RIPA 1X. Από το stock RIPA 10X που υπάρχει παρασκευάζεται RIPA 1X με την προσθήκη phosphatase inhibitor γιατί κάποιες από τις πρωτεΐνες που θα ελεγχθούν με ανασοαποτύπωση κατά Western είναι στη φωσφορυλιωμένη τους κατάσταση.

Για 1ml RIPA 1X:

- 100μl RIPA 10X
- 100μl phosphatase inhibitor
- 800μl ultra-pure νερό
- Προσθήκη του RIPA 1X στο falcon με το pellet. Καλή ανάδευση έτσι ώστε να επαναιωρηθεί.
- Απομάκρυνση από το falcon και μεταφορά σε eppendorf.
- Για τα επόμενα 30min ενώ τα eppendorf παραμένουν στον πάγο, πραγματοποιείται ανά ~5min vortex. Αυτό είναι το στάδιο όπου τα κύτταρα υπόκεινται λύση, σπάνε δηλαδή οι μεμβράνες τους. Η απομάκρυνση από τον πάγο μπορεί να χαλάσει τις πρωτεΐνες που απελευθερώνονται κατά το στάδιο αυτό.
- Μετά τους κύκλους vortex, τα eppendorf μεταφέρονται, μέσα σε πάγο, στη φυγόκεντρο στους 4°C και πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 20min.
- Μετά το τέλος της φυγοκέντρησης, αφαιρείται το υπερκείμενο και μεταφέρεται σε νέο eppendorf.
- Πραγματοποιείται εκ νέου φυγοκέντρηση στις 13.000rpm για 20min.
- Αφαίρεση υπερκειμένου και μεταφορά σε νέο eppendorf. Φυγοκέντρηση για 20min στις 13.000rpm. Συνολικά πραγματοποιούνται 3 φυγοκεντρήσεις. Σε περίπτωση εντοπισμού θολού υπερκειμένου, το δείγμα πρέπει να υποστεί

sonication. Το sonication είναι μια διαδικασία εφαρμογής υπερήχων στο DNA προκειμένου αυτό να διαλυθεί.

2.2.2 Πρότυπη καμπύλη και ποσοτικοποίηση πρωτεϊνών με τη μέθοδο Bradford

Η δοκιμασία πρωτεΐνης (Pierce™ BCA της Thermo Scientific™) είναι ένα συμβατό με απορρυπαντικό σκεύασμα που βασίζεται στο δικινχονινικό οξύ (BCA) για τη χρωματομετρική ανίχνευση και ποσοτικοποίηση της ολικής πρωτεΐνης. Αυτή η μέθοδος συνδυάζει την πολύ γνωστή αναγωγή του Cu^{+2} σε Cu^{+1} από την πρωτεΐνη σε ένα αλκαλικό μέσο (η αντίδραση διουρίας) με την εξαιρετικά ευαίσθητη και εκλεκτική χρωματομετρική ανίχνευση του κατιόντος χαλκού (Cu^{+1}) χρησιμοποιώντας ένα μοναδικό αντιδραστήριο που περιέχει δικινχονινικό οξύ. 1 Το πορφυρόχρωμο προϊόν αντίδρασης αυτής της ανάλυσης σχηματίζεται με τη χηλίωση δύο μορίων BCA με ένα ιώδιο χαλκού. Αυτό το υδατοδιαλυτό σύμπλοκο εμφανίζει ισχυρή απορρόφηση στα 562 nm που είναι σχεδόν γραμμική με αυξανόμενες συγκεντρώσεις πρωτεΐνης σε ευρεία περιοχή εργασίας (20-2000 $\mu\text{g} / \text{mL}$). Η μέθοδος BCA δεν είναι μια μέθοδος τελικού σημείου. Δηλαδή, το τελικό χρώμα συνεχίζει να αναπτύσσεται. Ωστόσο, μετά την επώαση, ο ρυθμός της συνεχιζόμενης ανάπτυξης χρώματος είναι επαρκώς αργός ώστε να επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Η μακρομοριακή δομή της πρωτεΐνης, ο αριθμός των πεπτιδικών δεσμών και η παρουσία τεσσάρων συγκεκριμένων αμινοξέων (κυστεΐνη, κυστίνη, τρυπτοφάνη και τυροσίνη) είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό χρώματος με BCA. Μελέτες με δι-, τρι- και τετραπεπτίδια δηλώνουν ότι η έκταση του σχηματισμού χρώματος προκαλείται από περισσότερο από το απλό άθροισμα των μεμονωμένων χαρακτηριστικών ομάδων που παράγουν χρώμα. Κατά συνέπεια, οι συγκεντρώσεις πρωτεΐνης γενικά προσδιορίζονται και αναφέρονται βάσει των προτύπων μιας κοινής πρωτεΐνης όπως η αλβουμίνη ορού βοοειδών (BSA). Μια σειρά αραιώσεων γνωστής συγκέντρωσης παρασκευάζονται από την πρωτεΐνη και αναλύονται μαζί με το

άγνωστο πριν προσδιοριστεί η συγκέντρωση του κάθε άγνωστου με βάση την πρότυπη καμπύλη. Εάν απαιτείται ακριβής ποσοτικοποίηση μιας άγνωστης πρωτεΐνης, συνιστάται επιλέγεται ένα πρότυπο πρωτεΐνης που είναι παρόμοιο σε ποιότητα με το άγνωστο.

Προετοιμασία του Working Reagent

1. Χρησιμοποιήθηκε ο παρακάτω τύπος για να προσδιορισθεί ο συνολικός όγκος του working reagent που απαιτείται:

$(\# \text{ δείγματα}) \times (\# \text{ αντίγραφα}) \times (\text{όγκος WR ανά δείγμα}) = \text{συνολικός απαιτούμενος όγκος WR}$

Ο όγκος WR ανά δείγμα είναι 200μl.

2. Παρασκευή του WR με ανάμειξη 50 μέρη BCA Reagent A με 1 μέρος BCA Reagent B.

Όταν το Reagent B προστίθεται αρχικά στο Reagent A, παρατηρείται θολότητα που εξαφανίζεται γρήγορα με ανάδευση για να βγει ένα καθαρό, πράσινο WR.

Το WR αποθηκεύεται σε σκοτεινό μέρος μέχρι να χρησιμοποιηθεί.

Παρασκευάστηκαν 2 διαφορετικές αραιώσεις (1/5 και 1/10) για τη μέτρηση του μέσου όρου των απορροφήσεών τους.

Για την αραιώση 1/5 : 5μl δείγματος + 20μl ultra-pure νερό (“up νερό”) ή PBS 1X

Για την αραιώση 1/10 : 5μl δείγματος + 45μl up νερό ή PBS 1X

ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

- Αρχικά σε κάθε πηγαδάκι προστίθεται η αντίστοιχη ποσότητα υπ νερό ή PBS 1X για την κάθε αραίωση (1/5 και 1/10).
- Ακολουθεί η προσθήκη των 5μl δείγματος. Πριν τη λήψη από το δείγμα γίνεται καλή ανάδευση καθώς και κατά την ανάμειξη στο πηγαδάκι.
- Στη συνέχεια, προστίθενται τα 200μl WR.
- Στη συνέχεια, το plate επωάζεται για 30min στον κλίβανο στους 37°C.
- Το μικροπλακίδιο τοποθετείται στο φωτόμετρο (EL-311 BIOTEK) στα 530nm για τη μέτρηση της απορρόφησης.

2.2.3 Ανοσοαποτύπωση πρωτεϊνών με Western Blot Analysis

Αντιδραστήρια

Γλυκίνη (Sigma), **SDS**-Sodium Dodecyl Sulfate (Sigma Aldrich), **Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane** (Scharlau), **Μεθανόλη** (Sigma Aldrich), **Ponceau S** (Applichem), **Διάλυμα ακρυλαμίδης** (BioRad), **Temed** (Applichem), **Γλυκερίνη** (Carl Roth), **Χλωριούχο Νάτριο** (SIGMA), **Tween20** (FisherBioreagents), **Αιθανόλη 100%** (Acros Organics), **Υδροχλωρικό Οξύ 36,5 – 38%** (Scharlau), **Pierce™ ECL Western Blotting Substrate** (ThermoFischer Scientific, Catalog number: 32106), **β-μερκαπτοαιθανόλη** (Merck)

DMSO (Calbiochem), **Trypan Blue** (Biochrome), **Θρυψίνη** (Biochrom),

Αντισώματα

Από τη Santa Cruz Biotechnology είναι προμηθευμένα τα αντισώματα Rsk-2 (E-1) (sc-9986), p-Rsk-2 (F-7) (sc-374664), p- Rsk (Ser227) -R (sc-12445-R). Από την εταιρεία Cell Signaling είναι τα GSK-3α (#4337), Phospho-GSK-3α/β (Ser21/9) (#8566), GSK-3β (#12456). Και από την Biolegend το GAPDH. Τα δευτερογενή αντισώματα είναι από την Cell Signaling, anti-rabbit IgG (#7074) και τη Cell Signaling το anti-mouse IgG.

Προετοιμασία της συσκευής του gel

Παράλληλη τοποθέτηση του μεγάλου και μικρού τζαμιού. Τα τζαμάκια πρέπει να είναι στεγνά. Στη συνέχεια τοποθετούνται στο πλαίσιο χύτευσης με το μικρό τζάμι να βρίσκεται στη μπροστά μεριά. Όταν τα τζαμάκια τοποθετηθούν στη θέση τους, κλείνουν τα έκκεντρα πίεσης για να στερεωθεί το σάντουιτς με τα τζαμάκια στο πλαίσιο χύτευσης.

Στη συνέχεια, με finntip ή σύριγγα, προστίθεται νερό ανάμεσα από τα τζαμάκια για να ελεγχθούν απώλειες που μπορεί να υπάρχουν και αφήνεται για 10-15min.

Προετοιμασία gel

- - Εφόσον ελεγχθεί ότι δεν υπάρχουν απώλειες από τα τζαμάκια, το νερό αφαιρείται για να προστεθούν τα Gels, Resolving και Stacking κατά σειρά.
- - Η πυκνότητα που θα έχει το Resolving gel είναι ανάλογη των μοριακών βαρών των πρωτεϊνών που θα ηλεκτροφορηθούν. Το Stacking gel έχει πάντα την ίδια πυκνότητα, που είναι 5%.

Οι πρωτεΐνες που θα ηλεκτροφορηθούν έχουν τα παρακάτω **μοριακά βάρη**:

P-Rsk-2 (Thr577)	80kDa
P-Rsk (Ser227)	90kDa
Rsk-2	80kDa
Gsk3 α	46kDa
Gsk3 β	51kDa
Phospho-Gsk3 α (Ser21)	51kDa
Phospho-Gsk3 β (Ser9)	46kDa
GAPDH	38kDa

Resolving Gel 8% :

DDH ₂ O	4.7ml
30% ακρυλαμίδη	2.7ml
Gel Buffer (1.5M TrisCl pH 8.8)	2.5ml
10% SDS	0.1ml ή 100 μ l

Stacking Gel (5%):

DDH ₂ O	5.7ml
30% ακρυλαμίδη	1.7ml
Gel Buffer (0.5M TrisCl pH 6.8)	2.5ml
10% SDS	0.1ml ή 100 μ l

Τα gels παρασκευάζονται χωρίς την προσθήκη APS (Sigma) και TEMED (Applichem), οι οποίοι είναι παράγοντες πολυμερισμού και προστίθενται λίγο πριν την εναπόθεση των gel ανάμεσα στα τζαμάκια.

Οι ποσότητες APS και TEMED που προστίθενται στα gels είναι οι εξής:

Resolving Gel

APS	50μl
TEMED	5μl

Stacking Gel

APS	50μl
TEMED	10μl

Αφού το Resolving ετοιμαστεί, προστίθεται ανάμεσα στα τζαμάκια σιγά-σιγά. Στη συνέχεια, από πάνω και με πολύ προσοχή το gel καλύπτεται με νερό για να μην στεγνώσει έως ότου πολυμεριστεί. Το Resolving τοποθετείται στα τζαμάκια μέχρι το σημείο που έχει σημειωθεί ότι φτάνει το χτενάκι που τοποθετείται μετέπειτα με το Stacking και σχηματίζει τα πηγαδάκια όπου φορτώνονται τα δείγματα.

- Αφαίρεση του νερού που καλύπτει το Resolving gel με διηθητικό χαρτί, αφού γίνει ορατό ότι έχει πολυμεριστεί (~30min).
- Προετοιμασία Stacking gel. Προσθήκη APS και TEMED στο Stacking gel και εισαγωγή αυτού ανάμεσα στα τζαμάκια πάνω από το Resolving. Τέλος, τοποθετείται το χτενάκι το οποίο σχηματίζει τα πηγαδάκια φόρτωσης των δειγμάτων. Ο χρόνος πολυμερισμού του Stacking είναι ~30-45min.
- Αφού το Stacking πολυμεριστεί, το χτενάκι αφαιρείται με προσοχή προς τα πάνω και τα πηγαδάκια ξεπλένονται με ήπιες κινήσεις με αποσταγμένο νερό.
- Αφαίρεση των τζαμιών από τη συσκευή και μεταφορά στη συσκευή με τα ηλεκτρόδια για την ηλεκτροφόρηση. Τα τζαμάκια τοποθετούνται με το μικρό τζάμι να βρίσκεται στην εσωτερική πλευρά.

- Τοποθέτηση της συσκευής ηλεκτροδίων όπου έχουν τοποθετηθεί τα τζαμάκια, στη συσκευή σύσφιξης.
- Πίεση προς τα κάτω της διάταξης ηλεκτροδίων ενώ κλείνονται οι δύο μοχλοί έκκεντρου του πλαισίου σύσφιξης.
- Τοποθέτηση στη μικρή δεξαμενή.
- Προσθήκη running buffer 1X στο διάστημα ανάμεσα στα τζαμάκια καθώς και στη μικρή δεξαμενή γενικά με προσεκτικές κινήσεις ώστε να αποφευχθεί η δημιουργία φυσαλίδων.

Running buffer 1X

900 ml ultra pure νερό

100 ml running buffer 10X

Προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση

- Με βάση την Bradford assay που πραγματοποιήθηκε μετά τη λύση των κυττάρων, υπολογίζονται οι ποσότητες που πρέπει να ληφθούν από κάθε δείγμα για να υπάρχουν τα επίπεδα πρωτεΐνης που επιθυμούνται, βασιζόμενα και στην πρότυπη καμπύλη. Τα eppendorf με τα δείγματα συμπληρώνονται με PBS 1X στο καθένα ανάλογα για να φτάσει στην ποσότητα που πρέπει να φορτωθεί και loading buffer και στη συνέχεια τοποθετούνται στα πηγαδάκια.
- Τα δείγματα συνήθως προετοιμάζονται με την αρχική προσθήκη PBS 1X στην κατάλληλη ποσότητα.
- Στη συνέχεια, συμπλήρωση με τη απαραίτητη ποσότητας δείγματος, η οποία γίνεται πάντα μετά από καλή ανάδευση του δείγματος με vortex ώστε να είναι αντιπροσωπευτική η ποσότητα.
- Το loading buffer, που προστίθεται τελευταίο, ολοκληρώνεται με την προσθήκη β-μερκαπταιθανόλης σε θάλαμο νηματικής ροής αλλά και η προσθήκη αυτού στα δείγματα γίνεται σε θάλαμο νηματικής ροής.

- Η ποσότητα loading buffer που προστίθεται σε κάθε δείγμα είναι το 1/3 του τελικού όγκου φορτώματος.
- Αφού γίνει και η προσθήκη του loading buffer και σε κάθε eppendorf δείγματος έχει γίνει μια τρύπα στο πάνω μέρος, τα δείγματα είναι έτοιμα να υποστούν βρασμό.
- Ένα μικρό beaker με απιονισμένο νερό προετοιμάζεται από πριν, σηνήθως στο στάδιο προετοιμασίας του **Stacking**, ώστε να έχει αποκτήσει τη θερμοκρασία 95°C στο στάδιο αυτό.

Τα δείγματα υπόκεινται σε βρασμό προκειμένου να ενεργοποιηθεί το SDS, που αποτελεί αποδιατακτικό παράγοντα έτσι ώστε οι πρωτεΐνες των δειγμάτων να μεταβούν από την τεταρτοταγή δομή σε πρωτοταγή και να γίνει δυνατή η ηλεκτροφόρηση.

- Τα δείγματα βρίσκονται σε θερμοκρασία 95°C για 5min.
- Μετά το τέλος του βρασμού, τα δείγματα μεταφέρονται απευθείας στον πάγο και συνεχίζεται να διατηρούνται εκεί.
- Ακολουθεί ανάδευση spin μερικών δευτερολέπτων.
- Πριν το φόρτωμα των δειγμάτων σε κάθε πηγαδάκι, προηγείται η τοποθέτηση **marker** έτσι ώστε να είναι δυνατό να ελεγχθεί το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών που εντοπίζονται. (Blue Star Prestained, protein marker, Cat.No. : MWPO4). Προσθήκη 4μl marker στα άκρα του gel.

Loading buffer

Glycerin	400μl
TrisCl 0.5M	100μl
SDS 20%	100μl
Bromophenol Blue	100μl
β-mercaptoethanol	100μl

- Μετά την προσθήκη marker στα άκρα, φορτώνονται και τα δείγματα με πιπέτα.
- Όταν ολοκληρωθεί και η διαδικασία φορτώματος των δειγμάτων στα πηγαδάκια, είναι έτοιμα για να ηλεκτροφορηθούν.
- Το καπάκι της συσκευής ηλεκτροφόρησης τοποθετείται με σωστή πολικότητα, δηλαδή έτσι ώστε το κόκκινο ηλεκτρόδιο να εφάπτεται με το κόκκινο καλώδιο και το μαύρο ηλεκτρόδιο αντίστοιχα με το μαύρο καλώδιο.
- Η ηλεκτροφόρηση πραγματοποιείται αρχικά στα 100V, μέχρι το μέτωπο των δειγμάτων να περάσει το σημείο όπου το stacking ενώνεται με το resolving gel (~20min). Στη συνέχεια τα Volt αυξάνονται στα 200 έως ώτου οι markers έχουν διαχωριστεί κατάλληλα για τα μοριακά βάρη των πρωτεϊνών που μελετώνται. Το stacking “συγκεντρώνει” τις πρωτεΐνες και στο resolving διαχωρίζονται.

Αφαίρεση gel- Μεταφορά στη μεμβράνη

- Όταν ολοκληρωθεί η ηλεκτροφόρηση, κλείνουμε το ρεύμα από τη συσκευή, αφαιρείται το καπάκι από τα ηλεκτρόδια.
- Στη συνέχεια, η συσκευή που συγκρατεί τα τζαμάκια αφαιρείται με προσοχή από τη δεξαμενή.
- Έχουν ετοιμαστεί από πριν, δοχεία με το transfer buffer 1X (βλ. “Πίνακας stock διαλυμάτων και αντιδραστηρίων”) για να τοποθετηθούν σε αυτά : τα τζαμάκια, η μεμβράνη PVDF (Millipore, Bedford, MA) όπου θα γίνει η μεταφορά των

πρωτεϊνών από το gel καθώς και η ασπρόμαυρη κασέτα που θα διατηρήσει gel και μεμβράνη κατά τη διάρκεια του transfer.

Transfer buffer 1X 700ml ultra pure νερό

200ml μεθανόλη

100ml transfer buffer 10X

- Τα δυο τζάμια διαχωρίζονται μεταξύ τους, σημειώνεται σε ποιο τζάμι έχει μείνει το gel προκειμένου να είναι σωστός ο προσανατολισμός και να αναγνωριστούν τα δείγματα στη συνέχεια.
- Το stacking αποκόπτεται και απορρίπτεται σε ειδικά απορρίματα καθώς περιέχει ακρυλαμίδα που είναι πολύ τοξική ουσία.
- Το gel που είναι ακόμη πάνω στο τζάμι, τοποθετείται στο δοχείο το transfer για να μην στεγνώσει.
- Η συσκευή και η δεξαμενή καθαρίζονται με αποσταγμένο νερό πολύ καλά μετά τη χρήση τους.
- Η μεμβράνη PVDF τοποθετείται στο δοχείο με τη μεθανόλη για 1min προκειμένου να ενεργοποιηθεί. Στη συνέχεια αφαιρείται και τοποθετείται σε δοχείο με transfer buffer 1X έως ότου χρησιμοποιηθεί.
- Αρχικά, για τη δημιουργία του “sandwich” όπου θα περιέχεται η μεμβράνη που γίνεται η μεταφορά πρωτεϊνών, τοποθετούνται στην ασπρόμαυρη κασέτα δύο βρεγμένα κατάλληλα σφουγγαράκια.
- Ακολούθως, με ένα στεγνό χαρτί, που εφάπτεται στο gel που έχει ηλεκτροφορηθεί, παίρνεται το gel και τοποθετείται πάνω στα βρεγμένα σφουγγαράκια που έχουν τοποθετηθεί πριν στο sandwich.
- Προσέχοντας συνεχώς να υπάρχει υγρασία στο σε όλα τα επίπεδα του sandwich του transfer, προστίθεται ένα ακόμη χαρτί αλλά βρεγμένο σε transfer. Για την αποφυγή φυσαλίδων πιέζεται απαλά το μέχρι στιγμής sandwich.

- Τέλος προστίθεται ένα ακόμη βρεγμένο σφουγγαράκι και η ασπρόμαυρη συσκευή κλείνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να μην κινηθούν τα στρώματα ανάμεσα και υπάρξει πρόβλημα στη μεταφορά των πρωτεϊνών από το gel στην PVDF μεμβράνη.
- Οι ασπρόμαυρες συσκευές στη συνέχεια προστίθενται με τη μαύρη πλευρά να είναι από την μαύρη πλευρά της συσκευής με τα ηλεκτρόδια. Σημειώνεται ποιο gel έχει τοποθετηθεί πιο κοντά στη μαύρη πλευρά και ποιο στη δεύτερη θέση, σε περίπτωση 2 παράλληλων στυπωμάτων (blot).
- Προσθήκη μικρού μαγνήτη και παγοκύστης. Το στύπωμα πραγματοποιείται σε μη υψηλές θερμοκρασίες και ο μαγνήτης βοηθά στη διατήρηση αυτής καθόλη τη διάρκεια που συμβαίνει.
- Τοποθέτηση του καπακιού με την κατάλληλη φορά των ηλεκτροδίων, μαύρο στο μαύρο και κόκκινο στο κόκκινο.
- Ρύθμιση της συσκευής ρεύματος (BioRad PowerPac 300 Powersupply) στα 100V και βλέποντας τα αρχικά Ampere, η διαδικασία διακόπτεται όταν αυτά φτάσουν +100. (π.χ. έναρξη: 252A -> λήξη: 352A). Η διάρκεια συνήθως είναι ~1hr.

Εντοπισμός – εμφάνιση πρωτεϊνών

Αφού ολοκληρωθεί και η διαδικασία μεταφοράς των πρωτεϊνών στην PVDF μεμβράνη, είναι επιθυμητή η εμφάνιση των πρωτεϊνών.

Αρχικά γίνεται χρώση της μεμβράνης με Ponceau χρωστική που είναι γρήγορη και απλή μέθοδος. Αφού γίνουν ορατές οι πρωτεΐνες με αυτή τη μέθοδο, συνεχίζεται με μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων στη μεμβράνη. Αυτό γίνεται έτσι ώστε στη συνέχεια που θα προστεθεί το πρώτο αντίσωμα, που είναι ειδικό για την πρωτεΐνη που επιθυμούμε να δούμε να είναι το σήμα όσο γίνεται πιο δυνατό, κάτι το οποίο είναι δυνατό όταν η πρόσδεση είναι εξειδικευμένη.

- Μπλοκάρισμα της PVDF μεμβράνης με 5% TTBS για 1hr.
- Προσθήκη κατάλληλου 1ου αντισώματος και επώαση για όλο το βράδυ.
- Την επόμενη μέρα, αφαιρείται το 1^ογενές αντίσωμα και ακολουθούν εκπλύσεις 5 λεπτών με TTBS 1X (3 φορές)
- Προσθήκη κατάλληλου 2^ογενούς αντισώματος
- Εκπλύσεις με TTBS 1X για 5 λεπτά (3 φορές)

Stock Διαλύματα

Transfer buffer 10X 1lt	Glycine	144g
	Trizma	30,3g

Running Buffer 10X pH 8.3	TrisBase	30,3g
	Glycine	144g
	SDS	10g

TrisCl 1,5M pH 8.8	TrisBase	181,5g
---------------------------	----------	--------

διάλυση σε 800ml dH₂O, προσαρμογή pH και στη συνέχεια συμπλήρωση με dH₂O μέχρι 1lt.

TrisCl 1M pH 7.4 TrisBase 121g

διάλυση σε 800ml dH₂O, προσαρμογή pH και στη συνέχεια συμπλήρωση με dH₂O μέχρι 1lt.

TrisCl 0,5M pH 6.8 TrisBase 121g

διάλυση σε 800ml dH₂O, προσαρμογή pH και στη συνέχεια συμπλήρωση με dH₂O μέχρι 1lt.

APS 10% 100mg υπερθειϊκό αμμώνιο (Ammonium Persulfate, Sigma) διάλυση σε 1ml dH₂O.

TTBS 5% (για 500ml) 450ml NaCl 0,9%
50ml TrisCl 1M
500μl Tween20
25ml FBS

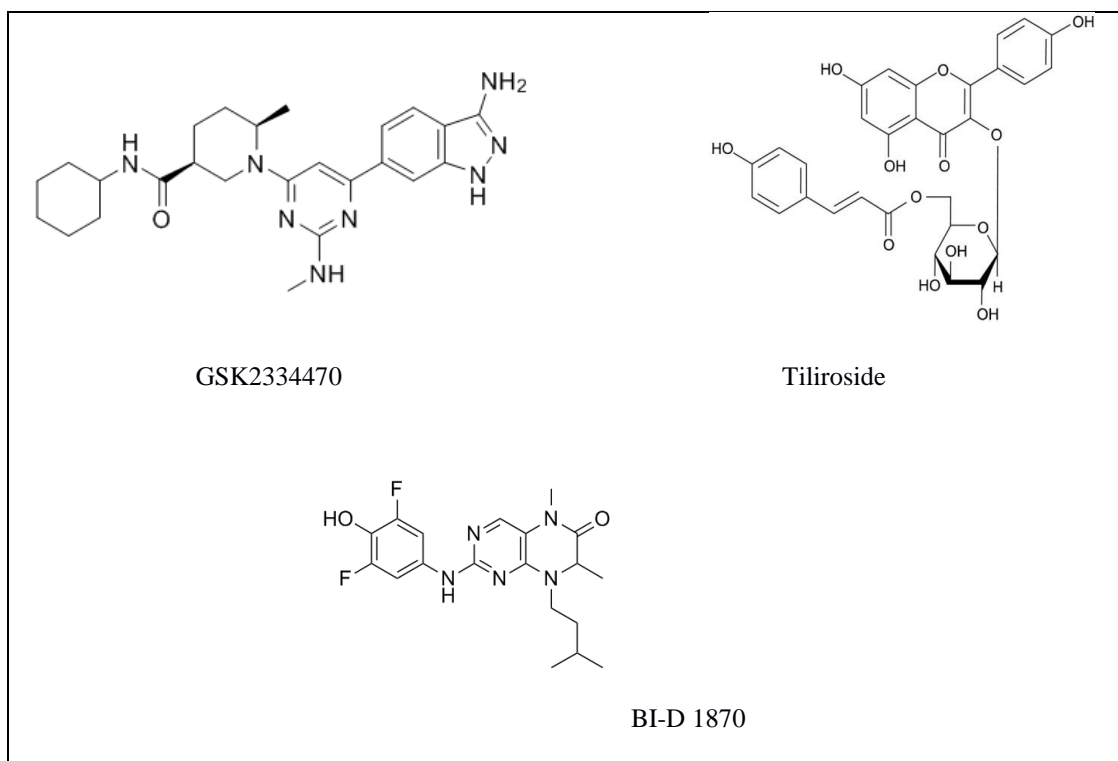
TTBS 1X 450ml NaCl 0,9%
50ml TrisCl 1M
500μl Tween20

Ponceau 100ml Οξικό Οξύ
0,1g Ponceau S

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην **Εικόνα 10** φαίνονται οι χημικές δομές των αναστολέων που χρησιμοποιήθηκαν, GSK2334470, BI-D 1870 και Tiliroside (Tac). Τα αποτελέσματα από την μελέτη της κυτταροτοξικής και κυτταροστατικής δράσης των αναστολέων έναντι των δύο διαφορετικών ανθρώπινων κυτταρικών σειρών του καρκίνου του θυρεοειδούς, παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1 και Γράφημα 1.1α



Ο αναστολέας BI-D1870 αποτελεί έναν ανταγωνιστικό αναστολέα του ριβοσώματος S6 για τις RSK1/2/3/4 με IC₅₀ 31 nM/24 nM/18 nM/15 nM σε in vitro μελέτες, αντίστοιχα . Έχει 10πλάσια με 100πλάσια επιλεκτικότητα για τις RSK σε σχέση με τις MST2, GSK-3β, MARK3 (28). Ο BI-D1870 αναστέλλει τις RSK1, RSK2, RSK3 και RSK4 με IC₅₀ 10-30 μM, αλλά δεν αναστέλλει σημαντικά δέκα άλλα μέλη κινασών AGC και πάνω από 40 άλλες πρωτεϊνικές κινάσες δοκιμασμένες σε 100 φορές υψηλότερες συγκεντρώσεις. Ο BI-D1870 δεν επηρεάζει τη φωσφορυλίωση των υποστρωμάτων που προκαλείται από αγωνιστές για έξι άλλες κινάσες AGC. Επιπλέον, ο BI-D1870 δεν καταστέλλει την φωσφορυλίωση του CREB, που προκαλείται από εστέρα φορβόλης ή EGF (28). Τα στοιχεία αυτά καταδεικνύουν την ειδικότητα αναστολής του BI-D1870.

Ο GSK2334470 είναι ένας πολύ εξειδικευμένος αναστολέας του PDK1 με IC₅₀ 10 nM (29). Το μικρό μόριο GSK2334470 αναστέλλει το PDK1, αλλά δεν καταστέλλει την δραστηριότητα 93 άλλων πρωτεϊνικών κινασών συμπεριλαμβανομένων και 13 AGC κινασών που σχετίζονται περισσότερο με το PDK1 σε συγκεντρώσεις έως και 500 φορές φορές υψηλότερες. Προσθήκη του GSK2334470 αφαιρεί τη φωσφορυλίωση της περιοχής του T βρόγχου και την ενεργοποίηση των SGK ισομορφών και S6K1. PDK1 αναστολείς επιδρούν στη φωσφορυλίωση του effect on phosphorylation of GSK3β σε κάποιες ανθεκτικές υποσειρές (30).

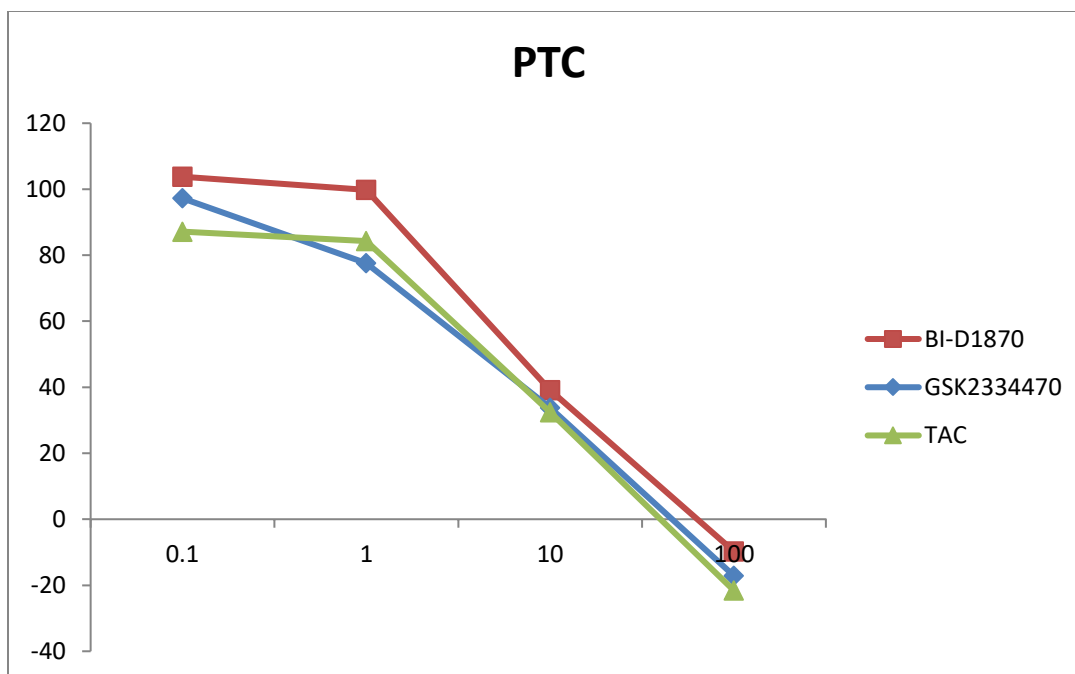
Ο περακετυλιωμένος τιλιοσίδης (Tac) (kaempferol-3-O-β-D-(6''-E-p-coumaroyl) glycopyranoside) αποτελεί παράγωγο φλαβονολών και έχει βρεθεί κυτταροτοξική δράση σε αρκετές καρκινικές σειρές σε σχέση με τις μη ακετυλιωμένες μορφές του. Βρίσκεται και απομονώνεται από τους καρπούς του *Platanus Orientalis* (31).

3.1 1 Κυτταροτοξική δράση των αναστολέων και μελέτ του ποσοστού ανάπτυξης των θυρεοειδικών καρκινικών κυτταρικών σειρών PTC ΚΑΙ 8505C

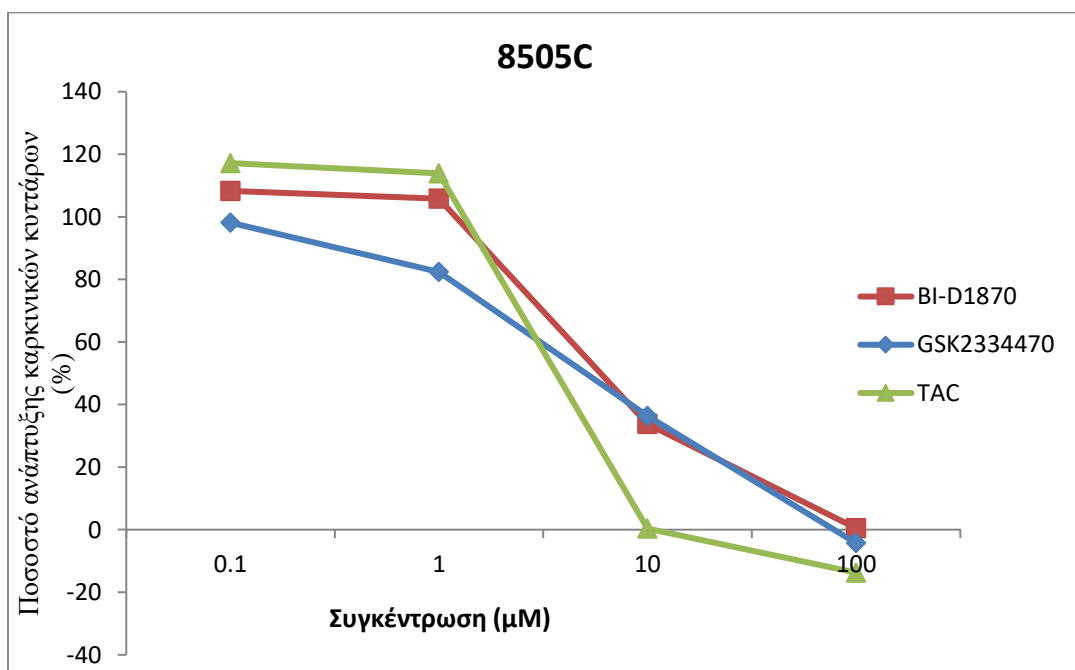
Τη σημαντικότερη δράση από τους τρεις αναστολείς που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη έχει ο παρακετυλιωμένος τιλιοσιδής (Tac) (kaempferol-3-O-β-D-(6''-E-p-coumaroyl) glycopyranoside). Η παράμετρος GI50 για το Tac είναι αρκετά χαμηλή έναντι των GI50 των άλλων δύο αναστολέων. Από τις δύο εξεταζόμενες κυτταρικές σειρές του θυρεοειδούς, μεγαλύτερη ευαισθησία έχει η 8505C στον Tac.

		PTC	8505C
TAC	GI50	4,6	2,5
	TGI	11,5	6,1
	LC50	79,3	>100,0
	TI	17,3	40,1
GSK2334470	GI50	6,7	7,3
	TGI	69,7	90,5
	LC50	>100,0	>100,0
	TI	15,0	13,6
BI-D1870	GI50	8,4	8,0
	TGI	82,1	>100,0
	LC50	>100,0	>100,0
	TI	11,9	12,5

Πίνακας 1: Κυτταροτοξική δράση των αναστολέων BI-D1870, GSK2334470, TAC στις θυρεοειδικές καρκινικές σειρές PTC και 8505C.

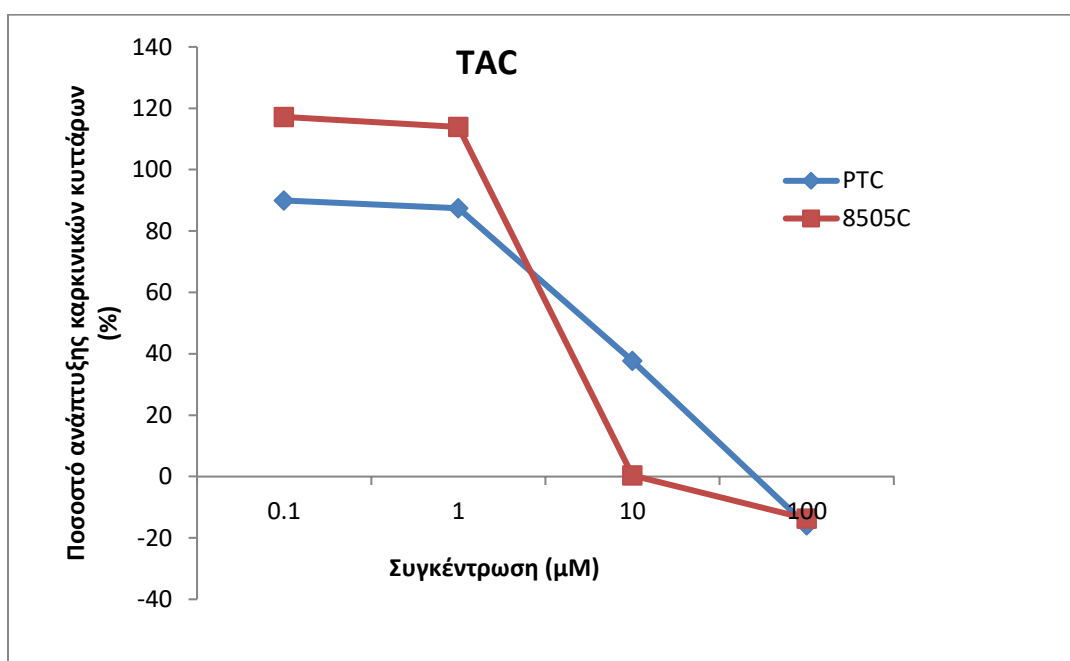


Γράφημα 1: Καμπύλες ανάπτυξης των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων PTC μετά την επίδραση αναστολέα σε διαφορετικές αραιώσεις (100, 10, 1, 0.1 μM)

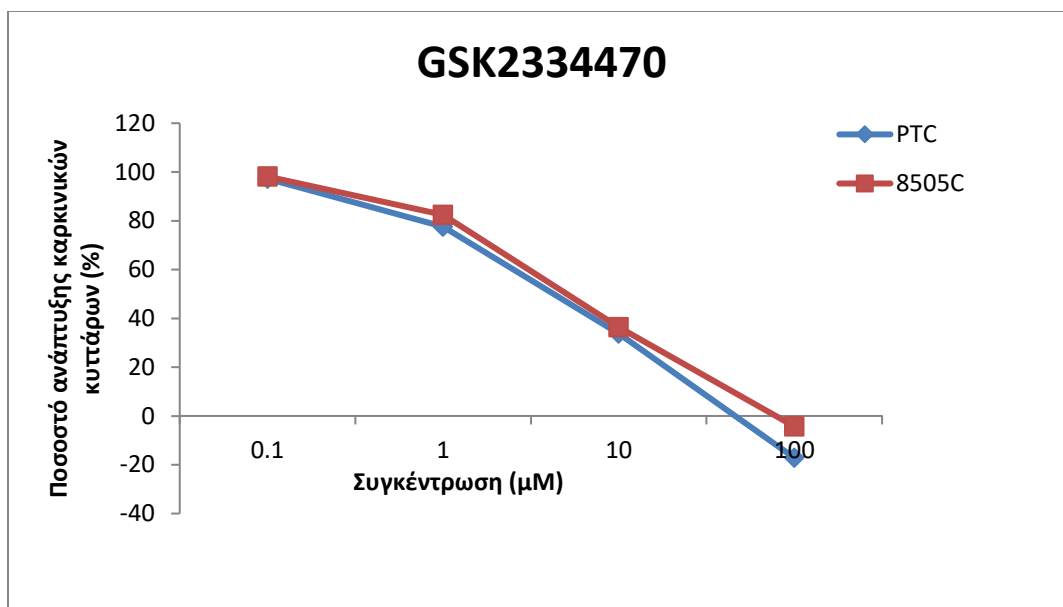


Γράφημα 2: Καμπύλες ανάπτυξης των θυρεοειδικών καρκινικών κυττάρων 8505c μετά την επίδραση αναστολέα σε διαφορετικές αραιώσεις (100, 10, 1, 0.1 μM)

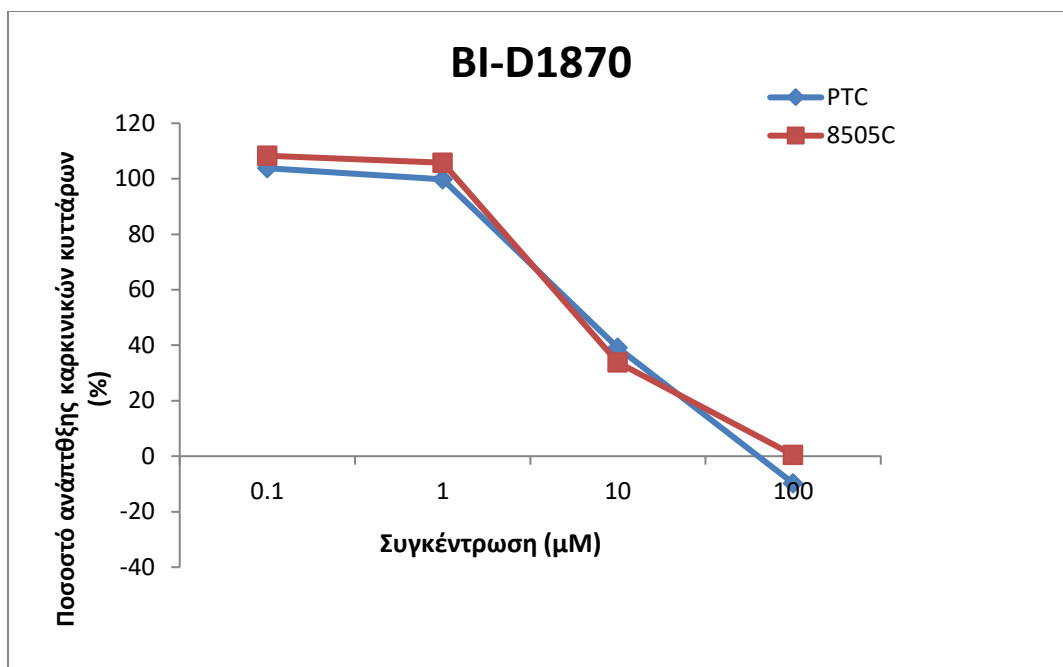
Συγκέντρωση αποτελεσμάτων ανά αναστολέα



Γράφημα 3: Καμπύλες ανάπτυξης των θυρεοειδικών καρκινικών κυτταρικών σειρών PTC και 8505C μετά την επίδραση του αναστολέα TAC σε διαφορετικές αραιώσεις (100, 10, 1, 0.1 μM)



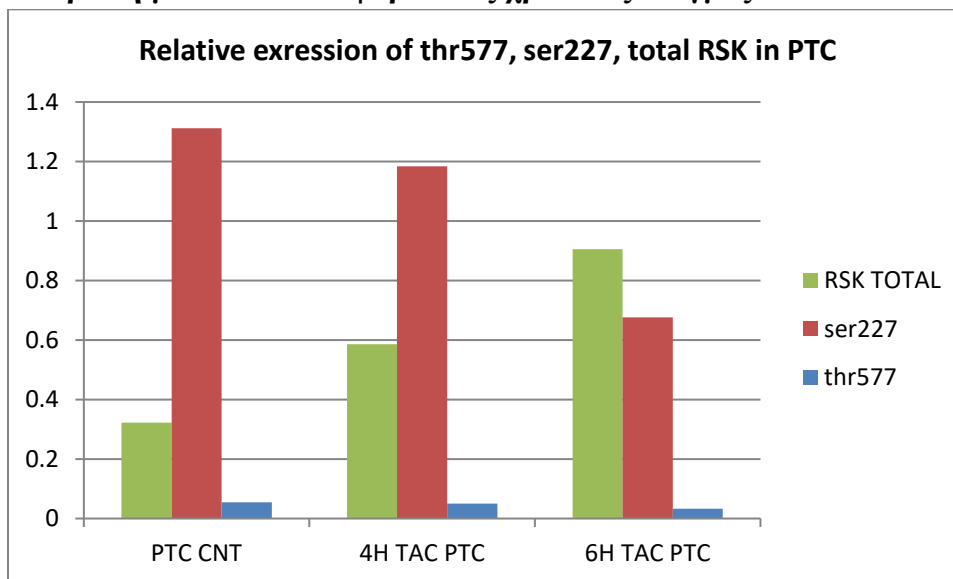
Γράφημα 4: Καμπύλες ανάπτυξης των θυρεοειδικών καρκινικών κυτταρικών σειρών PTC και 8505C μετά την επίδραση του αναστολέα GSK2334470 σε διαφορετικές αραιώσεις (100, 10, 1, 0.1 μM)



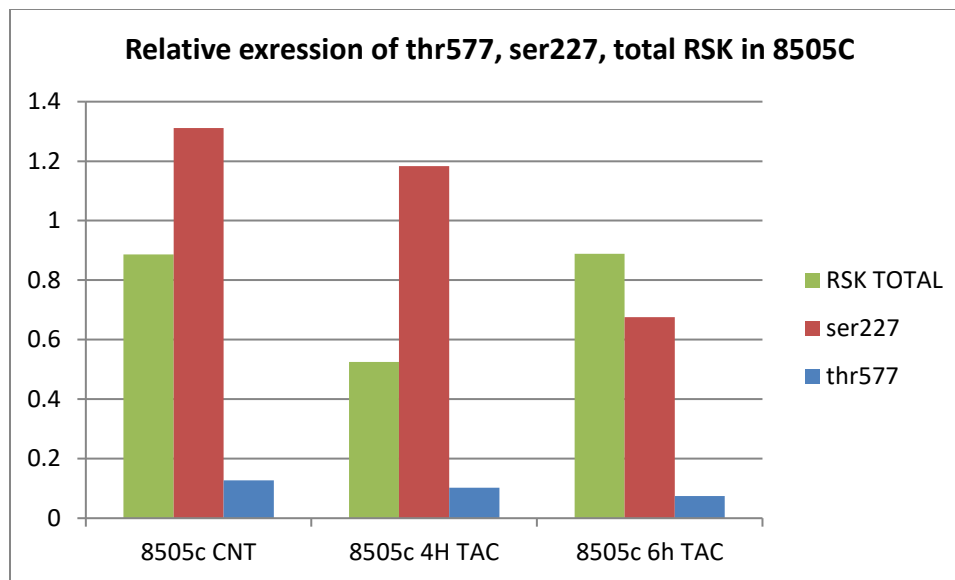
Γράφημα 5: Καμπύλες ανάπτυξης των θυρεοειδικών καρκινικών κυτταρικών σειρών PTC και 8505C μετά την επίδραση του αναστολέα BI-D1870 σε διαφορετικές αραιώσεις (100, 10, 1, 0.1 μM)

Στα γραφήματα 3, 4, 5 παρουσιάζονται οι καμπύλες ανάπτυξης των θυρεοειδικών κυτταρικών σειρών που θεραπεύτηκαν με τους αναστολείς Tac, GSK2334470 και BI-D1870. Η επώαση έγινε με 4 διαφορετικές αραιώσεις για 48 ώρες. Η υψηλότερη συγκέντρωση ήταν 100μM και η χαμηλότερη 0.1μM και τα ποσοστά ανάπτυξης υπολογίστηκαν με τη μέθοδο της τεχνικής σουλφοροδαμίνης.

3.2 Ποσοτική μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης p90RSK μετά από επίδραση με Tac σε διαφορετικές χρονικές στιγμές

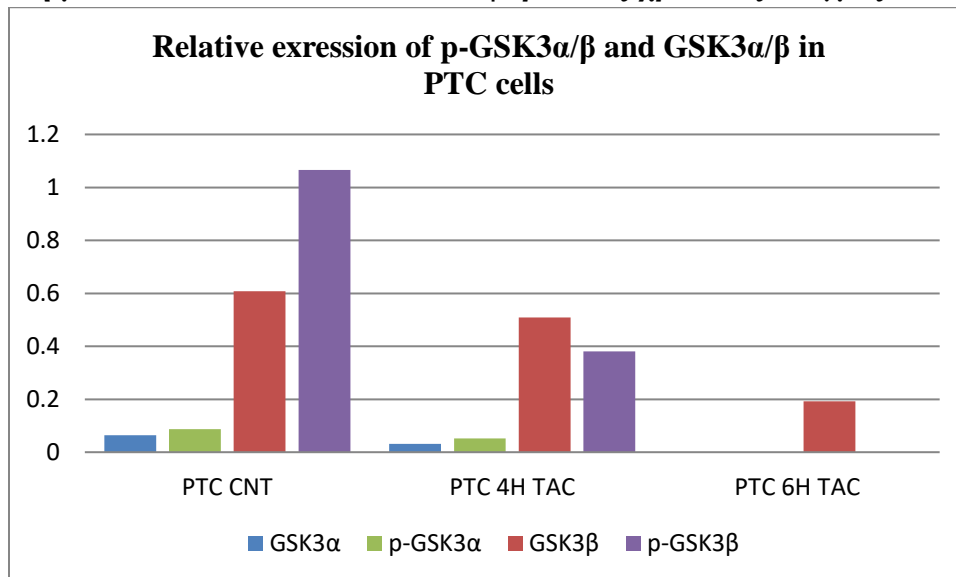


Γράφημα 6: Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της ολικής RSK και των δύο φωσφορυλιωμένων μορφών της σε ser227 και thr577 στα PTC σε διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με Tac (4 και 6 ώρες).

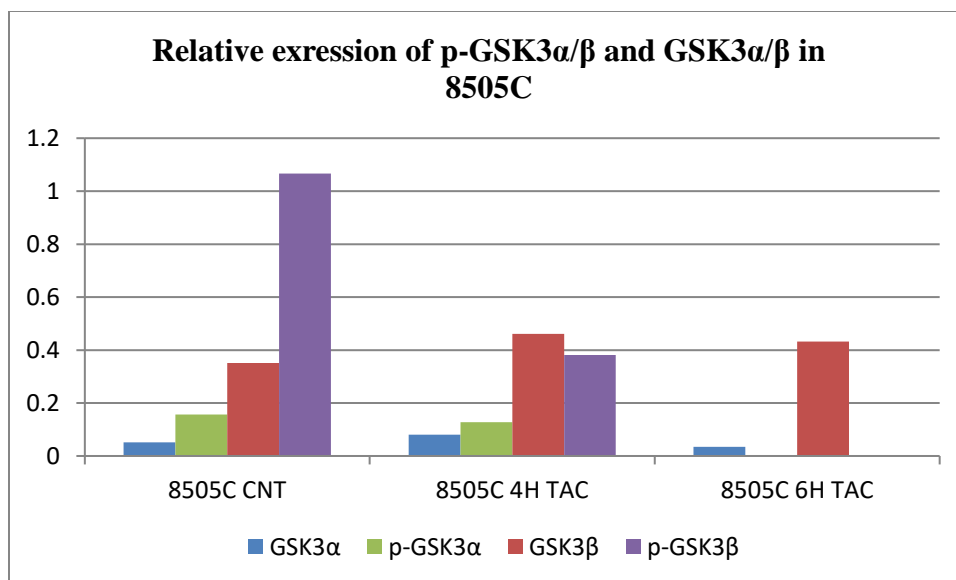


Γράφημα 7: Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της ολικής RSK και των δύο φωσφορυλιωμένων μορφών της σε ser227 και thr577 στα 8505C σε διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με Tac (4 και 6 ώρες).

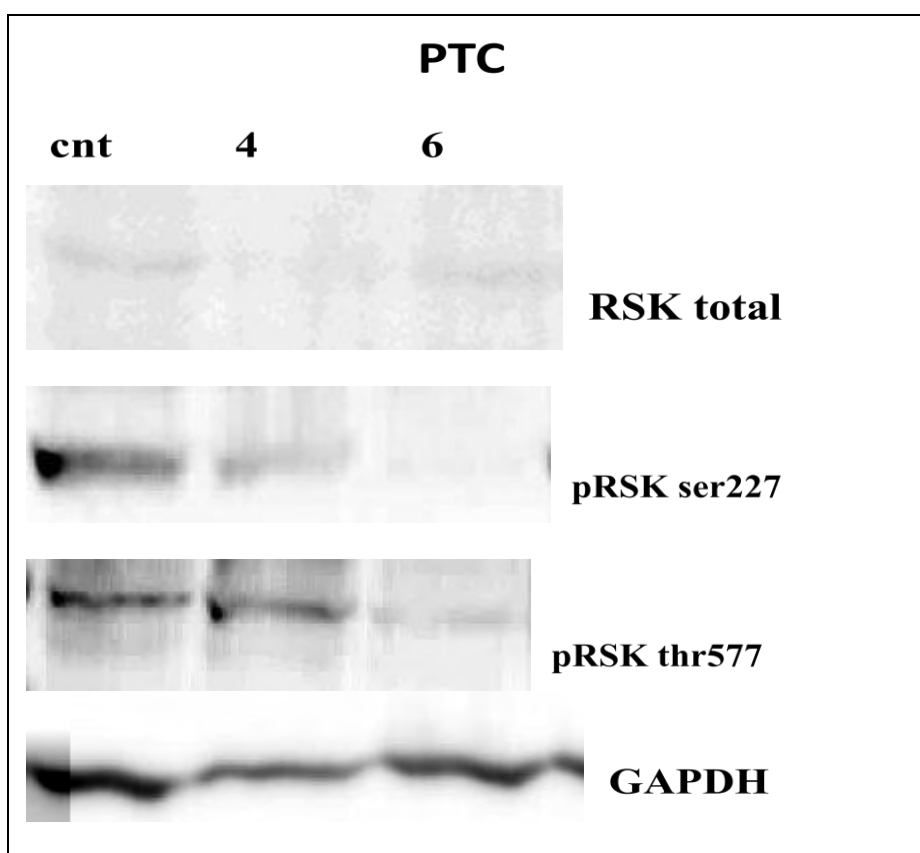
3.3 Ποσοτική μελέτη της έκφρασης της πρωτεΐνης p-GSK3α/β μετά από επίδραση με τον αναστολέα Tac σε διαφορετικές χρονικές στιγμές

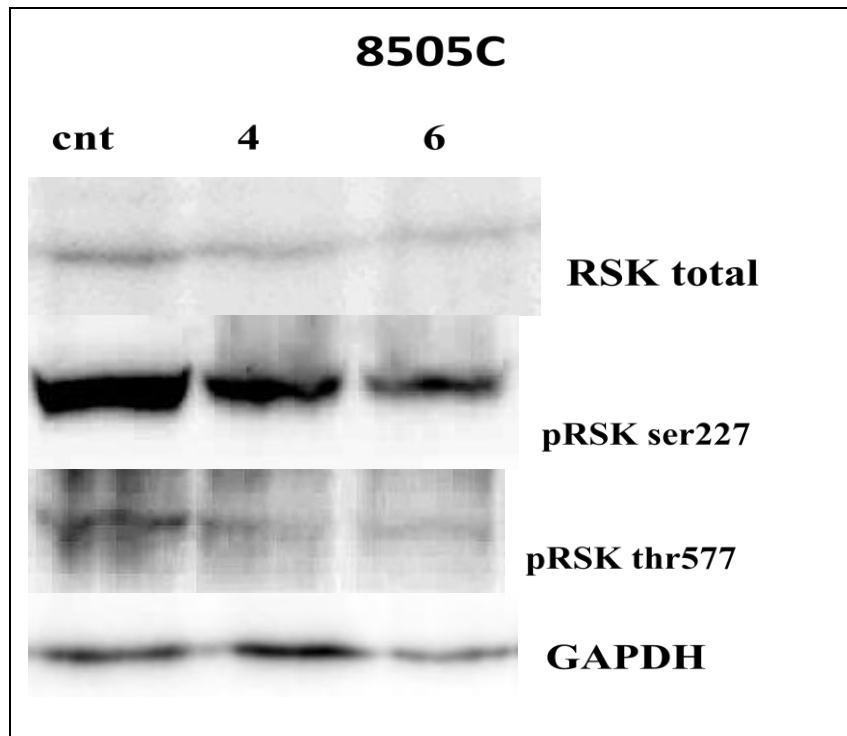


Γράφημα 8: Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της GSK3α/β και pGSK3α/β στον πληθυσμό κυττάρων PTC σε διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με Tac (4 και 6 ώρες).

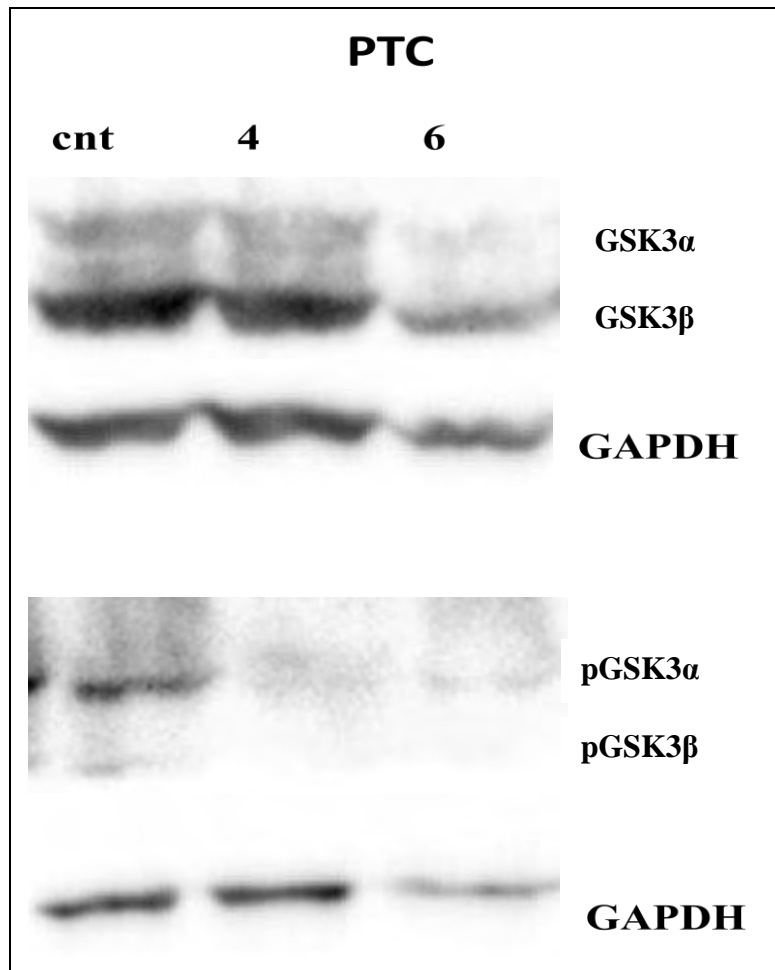


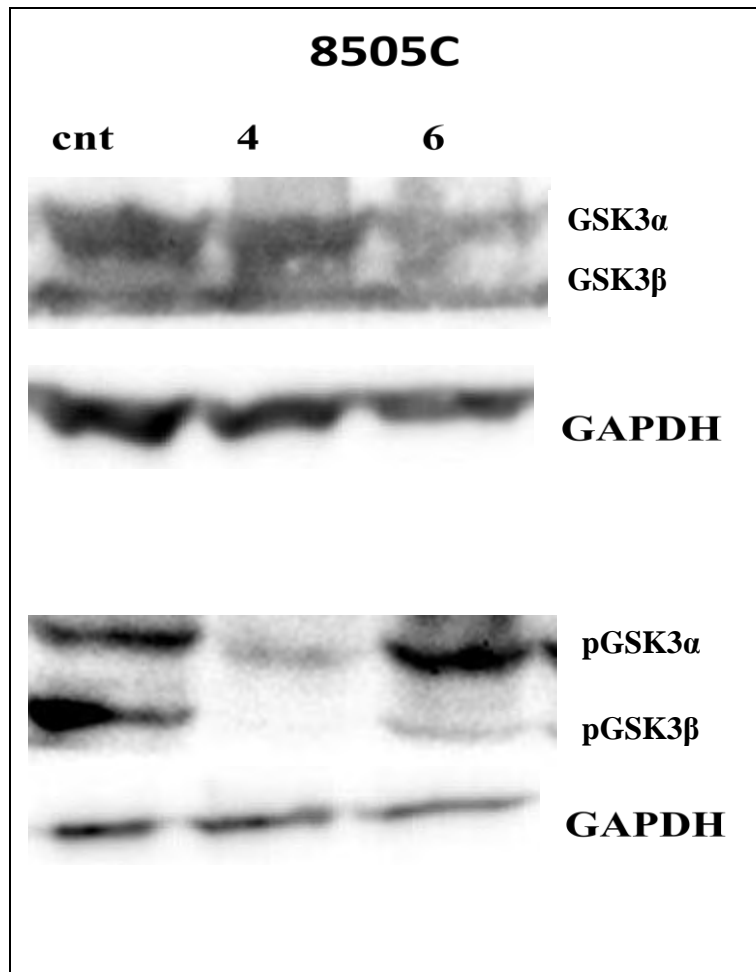
Γράφημα 9: Διαγραμματική απεικόνιση της έκφρασης της GSK3 α / β και pGSK3 α / β στην καρκινική σειρά 8505C σε διαφορετικές χρονικές στιγμές επώασης με Tac (4 και 6 ώρες)





Εικόνα 10: Κύτταρα του καρκίνου του θυρεοειδούς, θηλώδη (PTC) (A) και μη διαφοροποιημένα (8505C) (B) επωάστηκαν με 20 μ M Tac για 4 και 6 ώρες. Καλλιέργεια που επωάστηκε μόνο με καλλιεργητικό μέσο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Δείγματα από τις καλλιέργειες συλλέχθηκαν και με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης μελετήθηκε η έκφραση των RSK. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το ImageJ 1.44p, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA.





Εικόνα 11: Κύτταρα του καρκίνου του θυρεοειδούς, θηλώδη (PTC) (A) και μη διαφοροποιημένα (8505C) (B) επωάστηκαν με 20 μ M Tac για 4 και 6 ώρες. Καλλιέργεια που επωάστηκε μόνο με καλλιεργητικό μέσο χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας. Δείγματα από τις καλλιέργειες συλλέχθηκαν και με τη μέθοδο της ανοσοαποτύπωσης μελετήθηκε η έκφραση των GSK3 α / β . Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με το ImageJ1.44p, Wayne Rasband, National Institute of Health, USA.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τους αναστολείς που εξετάστηκαν με τη μέθοδο της σουλφοροδαμίνης (SRB) για τη δράση της κυτταροτοξικότητάς τους σε δύο κυτταρικούς πληθυσμούς του καρκίνου του θυρεοειδούς, βρέθηκε ότι ο Tac στα PTC κύτταρα έχει την καλύτερη κυτταροτοξική δράση με μικρή διαφορά ενώ στα 8505C είναι πιο έντονη η κυτταροτοξικότητά του.

Ο BI-D, p90RSK αναστολέας, και ο GSK2334470, PDK1 αναστολέας, εμφανίζουν παρόμοια κυτταροτοξική δράση και στον θηλοειδή (PTC) και στον μη διαφοροποιημένο καρκίνο του θυρεοειδούς (8505C). Στα πλαίσια της επιβεβαίωσης και επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων προηγούμενων μελετών που έχουν πραγματοποιηθεί στο εργαστήριο, τα δεδομένα αυτά συνάδουν με τα παλαιότερα.

Έχοντας δει τον Tac να έχει τη καλύτερη δραστηριότητα, ακολούθησαν επιδράσεις με Tac 20μM σε 2 διαφορετικές χρονικές στιγμές, 4 και 6 ώρες, και στους δύο πληθυσμούς κυττάρων. Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνεται να αυξάνεται η έκφραση της ολικής ριβοσωμικής S κινάσης (RSK total) και να μειώνεται η έκφραση της πρωτεΐνης όταν είναι φωσφορυλιωμένη στη θέση ser227, κάτι που παρατηρείται και στα δύο είδη κυττάρων. Το φαινόμενο αυτό επίσης αυξάνεται, αντίστοιχα η αύξηση της RSK και η μείωση της ser227, ανάλογα με τον χρόνο. Στις 6 ώρες επίδρασης του Tac, η μείωση της φωσφορυλιωμένης κινάσης στη ser227 είναι πιο έντονη σε σχέση με την επίδραση του Tac στις 4 ώρες. Τα επίπεδα της thr577 είναι αμετάβλητα στις δύο χρονικές στιγμές επίδρασης με Tac και σε σχέση με το δείγμα που χρησιμοποιήθηκε ως control. Τα επίπεδα έκφρασης των πρωτεϊνών γενικά είναι μεγαλύτερα στην 8505C κυτταρική σειρά σε σχέση με τα PTC κύτταρα.

Από τη μελέτη των επιπέδων έκφρασης της GSK3α/β μετά την επίδραση με Tac προκύπτει ότι ο Tac επηρεάζει τα επίπεδα της p-GSK3α/β. Η GSK3α εκφράζεται σε πολύ μικρό βαθμό σε γενικό πλαίσιο αλλά και συγκριτικά με την GSK3β. Τα επίπεδα της GSK3β είναι παρόμοια και στα δύο είδη κυττάρων και στις διαφορετικές χρονικές

επιδράσεις με Tac. Η p-GSK3 β , αντίθετα, μειώνεται όσο μεγαλώνει η ώρα επίδρασης με Tac, κάτι που συμβαδίζει και με τα αποτελέσματα της έκφρασης της RSK και με τα δεδομένα από άλλες μελέτες για τη ρύθμιση της GSK3 α/β μέσω RSK (38,39).

Με τα νέα δεδομένα ότι η επίδραση στην ενεργοποίηση των RSK μέσω φωσφορυλίωσης είναι εξαρτώμενα από τον χρόνο, καθώς και ότι τα επίπεδα της ενεργοποιημένης RSK σχετίζονται και με τη φωσφορυλίωση της GSK3 α/β δίνεται η δυνατότητα να διαλευκανθεί περαιτέρω το μονοπάτι που σχετίζεται με τον καρκίνο του θυρεοειδούς ώστε να αναπτυχθούν πιο εξειδικευμένοι αναστολείς.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Badalà, F., Nouri-mahdavi, K. & Raoof, D. A. NIH Public Access. Computer (Long Beach. Calif). 144, 724–732 (2008).
2. Couty, S., Westwood, I., Kalusa, A. & Cano, C. The discovery of potent ribosomal S6 kinase inhibitors by high- throughput screening and structure-guided drug design. *Oncotarget* 4, 1647–1661 (2013).
3. Aronchik, I. et al. Novel Potent and Selective Inhibitors of p90 Ribosomal S6 Kinase Reveal the Heterogeneity of RSK Function in MAPK Driven Cancers. *Mol. Cancer Res.* 24554780 (2014). doi:10.1158/1541-7786.MCR-13-0595
4. Brito, J. P., Hay, I. D. & Morris, J. C. Low risk papillary thyroid cancer. *BMJ* 348, g3045 (2014).
5. Couty, S., Westwood, I., Kalusa, A. & Cano, C. The discovery of potent ribosomal S6 kinase inhibitors by high- throughput screening and structure-guided drug design. *Oncotarget* 4, 1647–1661 (2013).
6. Kim, D., Akcakanat, A., Singh, G., Sharma, C. & Meric-Bernstam, F. Regulation and localization of ribosomal protein S6 kinase 1 isoforms. *Growth Factors* 27, 12–21 (2009).
7. Lara, R., Seckl, M. J. & Pardo, O. E. The p90 RSK family members: Common functions and isoform specificity. *Cancer Res.* 73, 5301–5308 (2013).
8. Liu, J. & Brown, R. E. Morphoproteomics demonstrates activation of mTOR pathway in anaplastic thyroid carcinoma: A preliminary observation. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 40, 211–217 (2010).
9. Magnuson, B., Ekim, B. & Fingar, D. C. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem. J.* 441, 1–21 (2012).
10. Moraitis, D. et al. SIN1, a critical component of the mTOR-Rictor complex, is overexpressed and associated with AKT activation in medullary and aggressive papillary thyroid carcinomas. *Surg. (United States)* 156, 1542–1548 (2014).
11. Robbins, H. L. & Hague, A. The PI3K/Akt Pathway in Tumors of Endocrine Tissues. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 6, 188 (2015).
12. Stack, B. C. et al. American Association of Clinical Endocrinologists and American College of Endocrinology Disease State Clinical Review: Postoperative Hypoparathyroidism - Definitions and Management. *Endocr. Pract.* 21, 674–685 (2015).
13. Sulzmaier, F. J. & Ramos, J. W. RSK isoforms in cancer cell invasion and metastasis. *Cancer Res.* 73, 6099–6105 (2013).
14. Nussey, S. and S. Whitehead, Chapter 3: The thyroid gland, in *Endocrinology: an integrated approach*. 2001, BIOS Scientific Publishers Limited: Oxford.
15. Dietrich, J.W., G. Landgrafe, and E.H. Fotiadou, TSH and thyrotropic agonists: key actors in thyroid homeostasis. *J Thyroid Res*, 2012. 2012(351864).

16. Cavalieri, R.R., Iodine metabolism and thyroid physiology: current concepts. *Thyroid*, 1997. 7(2): p. 177-181.
17. Ichikawa, K. and K. Hashizume, Cellular binding proteins of thyroid hormones. *Life Sci*, 1991. 49(21): p. 1513-1522.
18. National Cancer Institute. A snapshot of thyroid cancer. November 5, 2014. www.cancer.gov/researchandfunding/snapshots/thyroid. Accessed January 12, 2015.
19. Pellegriti, G., et al., Worldwide increasing incidence of thyroid cancer: update on epidemiology and risk factors. *J Cancer Epidemiol*, 2013. 2013: p. 965212.
20. Siegel, R., et al., Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin*, 2014. 64(1): p. 9-29.
21. Nguyen, Q. T., Joo Lee, E., Gingman Huang, M., In Park, Y., Khullar, A., & Plodkowski, R. A. (2015). Diagnosis and Treatment of Patients with Thyroid Cancer. *American Health & Drug Benefits*, 308(11), 30–40
22. Pacini, F., Vorontsova, T., Molinaro, E., Shavrova, E., Agate, L., Kuchinskaya, E., ... Pinchera, A. (1999). Thyroid consequences of the Chernobyl nuclear accident. *Acta Paediatrica (Oslo, Norway : 1992)*. Supplement, 88(433), 23–7.
23. W. J. Mack, S. Preston-Martin, L. Dal Maso et al., “A pooled analysis of case-control studies of thyroid cancer: cigarette smoking and consumption of alcohol, coffee, and tea,” *Cancer Causes and Control*, vol. 14, no. 8, pp. 773–785, 2003.
24. E. Peterson, P. De, and R. Nuttall, “BMI, diet and female reproductive factors as risks for thyroid cancer: a systematic review,” *PLoS One*, vol. 7, no. 1, Article ID e29177, 2012.
25. Liebner, D. A., & Shah, M. H. (2011). Thyroid cancer: pathogenesis and targeted therapy, 173–195.
26. Kouvaraki, M. A., Liakou, C., Paraschi, A., Dimas, K., Patsouris, E., Tseleni-balafouta, S., Rassidakis G. Z., Moraitis, D. Activation of mTOR signaling in medullary and aggressive papillary thyroid carcinomas. *Surgery*, 150(6),
27. Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening, 1(3), 1112–1116.
28. Sapkota, G. P., Cummings, L., Newell, F. S., Armstrong, C., Bain, J., Frodin, M., ... Alessi, D. R. (2007). BI-D1870 is a specific inhibitor of the p90 RSK (ribosomal S6 kinase) isoforms in vitro and in vivo. *Biochemical Journal*, 401(1), 29–38.
29. Najafov, A., Sommer, E. M., Axten, J. M., Deyoung, M. P., & Alessi, D. R. (2011). Characterization of GSK2334470, a novel and highly specific inhibitor of PDK1. *Biochemical Journal*, 433(2), 357–369

30. Qi, L., Toyoda, H., Xu, D., Zhou, Y., Sakurai, N., Amano, K., ... Komada, Y. (2015). PDK1-mTOR signaling pathway inhibitors reduce cell proliferation in MK2206 resistant neuroblastoma cells. *Cancer Cell International*, 1–14.
31. Demetzos, C., Magiatis, P., Typas, M. A., Dimas, K., Sotiriadou, R., Perez, S., & Kokkinopoulos, D. (1997). Biotransformation of the flavonoid tiliroside to 7-methylether tiliroside: Bioactivity of this metabolite and of its acetylated derivative. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 53(7), 587–592.
32. Kimberly A. Casavieri, Christopher J. Matheson, Donald, S. Backos, and Philip Reigan, “Selective Targeting of RSK Isoforms in Cancer”, 2017
33. Morten & J. Jensen, Claus & Merienne, Karine & Gammeltoft, Steen. (2000). A phosphoserine-regulated docking site in the protein kinase RSK2 that recruits and activates PDK1. *The EMBO journal*. 19. 2924-34. 10.1093/emboj/19.12.2924.
34. A McCubrey, James & S Steelman, Linda & E Bertrand, Fred & Davis, Nicole & Sokolosky, Melissa & Abrams, Steve & Montalto, Giuseppe & D'Assoro, Antonino & Libra, Massimo & Nicoletti, Ferdinando & Maestro, Roberta & Basecke, Jorg & Rakus, Dariusz & Gizak, Agnieszka & N Demidenko, Zoya & Cocco, Lucio & M Martelli, Alberto & Cervello, Melchiorre. (2014). GSK-3 as potential target for therapeutic intervention in cancer. *Oncotarget*. 5. 2881-911. 10.18632/oncotarget.2037.
35. Ayaz Najafov, Eeva M. Sommer, Jeffrey M. Axten, M. Phillip Deyoung, Dario R. Alessi *Biochemical Journal* Jan 15, 2011, 433(2)357-369;
36. Dimas, K., Demetzos, C., Mitaku, S., Vaos, B., Marselos, M., Tzavaras, T., & Kokkinopoulos, D. (1999). Cytotoxic activity and antiproliferative effects of a new semi-synthetic derivative of Ent-3 beta-hydroxy-13-epi-manoyl oxide on human leukemic cell lines. *Anticancer Research*, 19(5B), 4065–4072.
37. Romeo, Y., Zhang, X., & Roux, P. P. (2012). Regulation and function of the RSK family of protein kinases, 569, 553–569.

38. Sutherland, C., Leighton, I. A., & Cohen, P. (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J*, 296, 15–19.
39. Eldar-Finkelman, H., Seger, R., Vandenheede, J. R., & Krebs, E. G. (1995). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 by epidermal growth factor is mediated by mitogen-activated protein kinase/p90 ribosomal protein S6 kinase signaling pathway in NIH/3T3 cells. *Journal of Biological Chemistry*. <http://doi.org/10.1074/jbc.270.3.98>
40. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/15070063>
41. <http://www.sigmaaldrich.com/life-science/cell-culture/learning-center/media-expert/glutamine.html>